ORSAY
N° d'Ordre
1530

THÈSE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

Monique MANDRINO

Sujet de la Thèse :

Données électrophysiologiques sur le système tubulaire transverse de la fibre musculaire striée de Batracien

SOUTENUE LE 3 JUILLET 1975, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. P. H. BENOIT — PRÉSIDENT

F. CHEVALLIER
E. CORABŒUF
Y. M. GARGOUÏL
L. TAUC
} EXAMINATEURS

ORSAY
N° d'Ordre
1530

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

Monique MANDRINO

Sujet de la Thèse:

Données électrophysiologiques sur le système tubulaire transverse de la fibre musculaire striée de Batracien

SOUTENUE LE 3 JUILLET 1975, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. P. H. BENOIT — PRÉSIDENT

F. CHEVALLIER
E. CORABŒUF
Y. M. GARGOUÏL
L. TAUC
} EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie générale, Université PARIS XI, Centre d'Orsay.

Directeur : Monsieur le Professeur Paul H. BENOIT.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548908_0027

SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE 3

I - PROPRIETES ELECTRIQUES DES MEMBRANES EXCITABLES.

1) Potentiel de membrane au repos.

2) Potentiel d'action.

3) Théorie ionique de HODGKIN-HUXLEY.

a) Technique du potentiel imposé.

b) Théorie ionique.

c) Application à la fibre musculaire striée de Batracien.

II - STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE.

III - ROLE DU SYSTEME TUBULAIRE TRANSVERSE.

MATERIEL ET METHODES 27

I - PREPARATION BIOLOGIQUE.

II - SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES.

III - METHODES D'ENREGISTREMENT.

1) Technique de la double séparation de saccharose.

2) Cuve d'expérimentation.

3) Electrodes externes.

4) Montage de la préparation dans la cuve.

5) Obtention et montage des fibres détubulées.

6) Dispositif électronique.

a) Circuit de mesure en courant imposé.

b) Circuit de mesure en potentiel imposé.

7) Conditions générales d'expérimentation.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE 39

I - CARACTERISTIQUES ET NATURE IONIQUE DU COURANT ENTRANT TARDIF.

Caractéristiques du courant tardif.

1) Décours - amplitude - durée.

2) Evolution en fonction du potentiel imposé.

3) Evolution comparée des courants initial et tardif.

4) Relation courant-potentiel.

Nature ionique du courant tardif.

1) Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en sodium.

2) Action de la tétrodotoxine.

3) Effet de solutions appauvries en calcium ou dépourvues de calcium.

4) Action du chlorure de manganèse.

II - LOCALISATION DU COURANT ENTRANT TARDIF.

1) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement des courants initial et tardif.

2) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium global.

3) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium de fibre détubulée.

DISCUSSION.

DEUXIEME PARTIE 74

ETUDE DE L'INACTIVATION DU SYSTEME SODIQUE.

1) Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

a) Cas d'un courant sodium global.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

2) Effet de préhyperpolarisations en présence de tetraéthylammonium.

a) Cas d'un courant sodium global.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

3) Effet de préhyperpolarisations en milieu sans potassium.

DISCUSSION.

TROISIEME PARTIE 105

I - ETUDE DES COURANTS DE MEMBRANE DE FIBRES DETUBULEES.

1) Courant sodique entrant.

2) Courant potassique sortant.

3) Mesure de la résistance membranaire et de la rectification retardée.

II - ETUDE DE L'INACTIVATION DU SYSTEME SODIQUE.

Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

DISCUSSION.

RESUME GENERAL 123

BIBLIOGRAPHIE 125

INTRODUCTION

La fibre musculaire striée de Batracien présente une importante formation membranaire, le système tubulaire transverse ou système T.

Ce système intervient comme un élément essentiel dans le couplage excitation-contraction et il est à l'origine de certains phénomènes électriques observés sur la fibre musculaire squelettique de Batracien.

Si le rôle joué par le système T est connu depuis les travaux de HUXLEY et TAYLOR (1958), ce n'est que plus récemment qu'a été suggérée par divers auteurs l'hypothèse suivant laquelle la membrane tubulaire serait, comme la membrane plasmique externe, excitable, alors que l'on avait d'abord considéré les variations de potentiel à ce niveau comme purement passives.

C'est dans le cadre de cette hypothèse que se situe la première partie de notre travail dans laquelle sont étudiées les caractéristiques électriques et la nature ionique d'un courant pouvant être attribué à la paroi tubulaire et traduisant une augmentation régénérative de conductance au sodium.

La deuxième partie concerne l'étude de l'évolution de ce courant sodique tubulaire sous l'effet de préhyperpolarisations membranaires d'amplitude élevée. Nous observons une diminution de l'amplitude de ce courant. Ce phénomène est supprimé par la présence de tetraéthylammonium, inhibiteur de la perméabilité potassique, ou l'absence de potassium dans le milieu de survie. Nous envisageons l'existence d'un courant potassium sortant, rapide et transitoire, engendré par la préhyperpolarisation et contemporain du courant sodique entrant qui apparaît ainsi diminué.

INTRODUCTION

La fibre musculaire striée de Batracien présente une importante formation membranaire, le système tubulaire transverse ou système T.

Ce système intervient comme un élément essentiel dans le couplage excitation-contraction et il est à l'origine de certains phénomènes électriques observés sur la fibre musculaire squelettique de Batracien.

Si le rôle joué par le système T est connu depuis les travaux de HUXLEY et TAYLOR (1958), ce n'est que plus récemment qu'a été suggérée par divers auteurs l'hypothèse suivant laquelle la membrane tubulaire serait, comme la membrane plasmique externe, excitable, alors que l'on avait d'abord considéré les variations de potentiel à ce niveau comme purement passives.

C'est dans le cadre de cette hypothèse que se situe la première partie de notre travail dans laquelle sont étudiées les caractéristiques électriques et la nature ionique d'un courant pouvant être attribué à la paroi tubulaire et traduisant une augmentation régénérative de conductance au sodium.

La deuxième partie concerne l'étude de l'évolution de ce courant sodique tubulaire sous l'effet de préhyperpolarisations membranaires d'amplitude élevée. Nous observons une diminution de l'amplitude de ce courant. Ce phénomène est supprimé par la présence de tetraéthylammonium, inhibiteur de la perméabilité potassique, ou l'absence de potassium dans le milieu de survie. Nous envisageons l'existence d'un courant potassium sortant, rapide et transitoire, engendré par la préhyperpolarisation et contemporain du courant sodique entrant qui apparaît ainsi diminué.

Les travaux effectués parallèlement sur des fibres détubulées par choc osmotique font l'objet de la troisième partie.

HISTORIQUE

I - PROPRIETES ELECTRIQUES DES MEMBRANES EXCITABLES.

1) Potentiel de membrane au repos.

2) Potentiel d'action.

3) Théorie ionique de HODGKIN - HUXLEY.

a) Technique du potentiel imposé.

b) Théorie ionique.

c) Application à la fibre musculaire striée de Batracien.

II - STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE.

III - ROLE DU SYSTEME TUBULAIRE TRANSVERSE.

I - PROPRIETES ELECTRIQUES DES MEMBRANES EXCITABLES.

Les tissus excitables ont des concentrations ioniques intra et extracellulaires très différentes comme le montre le tableau suivant donné par HOROWICZ (1961) dans le cas de la fibre musculaire striée de Grenouille :

Intérieur	Extérieur
140 mM K^+	2,5 mM K^+
9,2 mM Na^+	120 mM Na^+
3,6 mM Cl^-	120 mM Cl^-

La première théorie ionique du potentiel de membrane est formulée par BERNSTEIN (1902-1912) : à l'état de repos, la membrane est uniquement perméable au potassium et son potentiel est donc celui d'une pile de concentration au potassium ; pendant l'activité, la membrane devient perméable à tous les ions ce qui se traduit par une annulation de la polarisation de repos.

La théorie du potentiel d'action selon BERNSTEIN est infirmée en 1939 par HODGKIN et HUXLEY ; en effet, des enregistrements intracellulaires de potentiel sur l'axone géant de Calmar leur permettent de montrer l'inversion de la polarisation de la membrane pendant l'activité. Le rôle de l'ion sodium pendant le potentiel d'action est plus tard mis en évidence : HODGKIN et KATZ (1949), HUXLEY et STÄMPFLI (1951) montrent que la phase de dépolarisation du potentiel d'action correspond à une augmentation rapide et transitoire de la perméabilité membranaire aux ions sodium tandis que la phase de repolarisation traduit une augmentation retardée de la perméabilité aux ions potassium. Ainsi, pendant le potentiel de pointe, le potentiel de membrane tendrait vers le potentiel d'équilibre du sodium (E_{Na}), ce qui explique l'inversion constatée.

C'est en 1952 que HODGKIN et HUXLEY proposent une formulation mathématique de la nouvelle théorie ionique. La technique de voltage imposé conçue par COLE (1949) et par MARMONT (1949) leur permet de déterminer et d'étudier les différentes composantes du courant ionique global qui traverse la membrane pendant un potentiel d'action et qui est égal à :

$$I_t = I_C + I_{Na} + I_K + I_L$$

I_C est le courant capacitif, I_{Na} le courant sodique entrant, I_K le courant potassique sortant retardé et I_L le courant de fuite.

Le modèle théorique de HODGKIN et HUXLEY établi à partir de résultats expérimentaux sur l'axone géant de Calmar est, comme le montre NOBLE (1966), applicable à d'autres tissus excitables.

1) Potentiel de membrane au repos.

BERNSTEIN supposait que la membrane au repos était seulement perméable aux ions potassium : le potentiel de repos était défini comme celui d'une pile de concentration au potassium.

La théorie de BOYLE et CONWAY (1941) propose un double équilibre de DONNAN : la membrane est perméable aux ions potassium et aux ions chlorure. Le potentiel de membrane au repos est défini, à partir de l'équation de NERNST, par la formule suivante :

$$E = \frac{RT}{F} \text{ Log } \frac{[K^+]_{ex}}{[K^+]_{in}} = \frac{RT}{F} \text{ Log } \frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{ex}}$$

R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, F le Faraday.
$[K^+]_{ex}$ et $[Cl^-]_{ex}$, $[K^+]_{in}$ et $[Cl^-]_{in}$ représentent les activités des ions potassium et chlorure dans les milieux extra et intracellulaire.

Cependant, l'utilisation de sodium radioactif permet ultérieurement de mettre en évidence une faible perméabilité de la membrane au sodium, à l'état de repos.

C'est en 1949 que HODGKIN et KATZ établissent, à partir de la théorie dite du champ constant de GOLDMAN (1943), une équation qui, en ne tenant compte que des ions Na^+, K^+ et Cl^-, définit ainsi le potentiel de membrane au repos :

$$E = \frac{RT}{F} \text{ Log } \frac{P_K [K^+]_{ex} + P_{Na} [Na^+]_{ex} + P_{Cl} [Cl^-]_{in}}{P_K [K^+]_{in} + P_{Na} [Na^+]_{in} + P_{Cl} [Cl^-]_{ex}}$$

P_K, P_{Na} et P_{Cl} sont les perméabilités de la membrane aux ions K^+, Na^+ et Cl^-.

Etant données les faibles valeurs de P_{Na} et du fait que les ions chlorure peuvent être considérés comme distribués passivement de part et d'autre de la membrane, le potentiel de repos E_R sera voisin du potentiel d'équilibre du potassium E_K. Cependant, E_R étant inférieur à E_K, la cellule a tendance à perdre du potassium en même temps qu'elle gagne du sodium par suite de sa légère perméabilité au repos. Un mécanisme de transport actif qui expulse le sodium et récupère le potassium permet le maintien des concentrations.

2) Potentiel d'action.

Le potentiel d'action présente une phase ascendante rapide correspondant à une augmentation importante et transitoire de la perméabilité de la membrane aux ions sodium (activation sodium) et une phase descendante de repolarisation traduisant l'augmentation retardée de la perméabilité au potassium (activation potassium) et la diminution de la perméabilité au sodium (inactivation sodium).
Au sommet du potentiel d'action, le potentiel de membrane tend vers le potentiel d'équilibre du sodium défini par la relation :

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \text{ Log } \frac{[Na^+]_{ex}}{[Na^+]_{in}}$$

Le potentiel de pointe a, chez la fibre musculaire striée, une amplitude comprise entre 120 et 140 mV et dure environ 2 ms.
L'amplitude du potentiel de pointe dépend de la concentration extracellulaire en sodium.

Potentiel consécutif.

La réponse électrique de la fibre musculaire striée est caractérisée par une ample post-dépolarisation (20 à 30 mV ; 20 ms environ) qui suit la phase rapide de repolarisation. Dans sa phase précoce, le décours de ce potentiel est variable (FRANK, 1957 ; PERSSON, 1963) : deux types de potentiel sont représentés sur la figure 1 (PERSSON, 1963). Le potentiel consécutif a été d'abord considéré comme représentant un retour passif du potentiel de membrane à sa valeur de repos. Cependant, PERSSON (1963) montre que, si cela est valable pour la phase la plus tardive, la phase précoce correspond à une augmentation de la conductance membranaire.

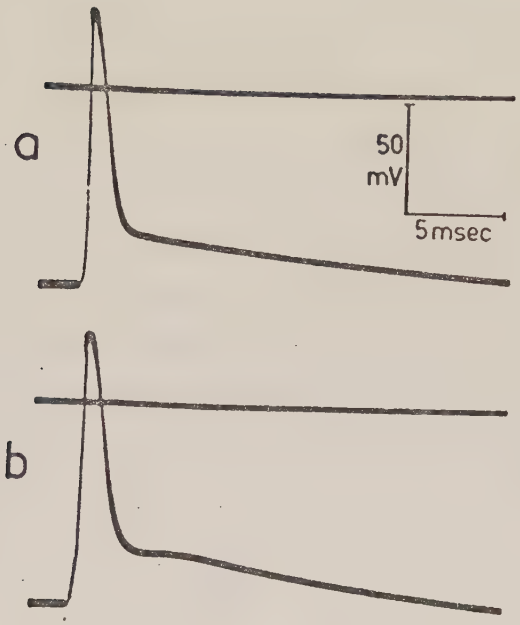


Figure 1 - Potentiels d'action de fibre musculaire enregistrés par micro-électrodes intracellulaires (PERSSON, 1963).

D'autre part, le ressaut de dépolarisation fréquemment observé (figure 1b) est interprété comme résultant d'une entrée de sodium dans la fibre (FRANK, 1957 ; MANDRINO, 1959 ; PERSSON, 1963).
La découverte du système tubulaire transverse et ultérieurement l'utilisation de la technique de HOWELL et JENDEN (1967) permettant la destruction sélective de ce système ont conduit à relier le potentiel consécutif à l'existence de cette structure (voir chapitres II et III).

3) Théorie ionique de HODGKIN-HUXLEY.

a) Technique du potentiel imposé.

La technique du potentiel imposé (voltage-clamp) mise au point par COLE (1949) et par MARMONT (1949) permet d'étudier le courant qui traverse une portion de membrane lorsque son potentiel est maintenu pendant une durée déterminée à un niveau constant. Une différence de potentiel est appliquée à la membrane à l'aide d'un générateur ; afin de maintenir ce potentiel rigoureusement constant, on utilise un amplificateur à contre réaction totale externe qui fournit un courant compensant à tout moment le courant membranaire :

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + I_i$$

I est le courant de membrane global, I_i le courant ionique, V le déplacement du potentiel de membrane à partir de sa valeur de repos, C_m la capacité de la membrane.
La capacité membranaire C_m est très rapidement chargée, ce qui permet en théorie de supprimer virtuellement cette capacité et en pratique de dissocier le courant capacitif et le courant ionique dont la valeur est alors donnée par la mesure du courant délivré par l'amplificateur.

Plusieurs types de montages ont été utilisés suivant les structures étudiées c'est à dire en fonction des électrodes d'enregistrement :

- électrodes intracellulaires de grande surface dans le cas de l'axone géant de Calmar (HODGKIN, HUXLEY et KATZ, 1952).

- microélectrodes intracellulaires sur la fibre musculaire striée de Batracien (ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN, 1966, 1968, 1970).

- électrodes extracellulaires (technique de la double séparation de

saccharose) pour la fibre sino-auriculaire de Grenouille (ROUGIER, VASSORT et STÄMPFLI, 1968), la fibre musculaire squelettique (ILDEFONSE, 1970). Ces différents montages sont représentés sur la figure 2.

b) Théorie ionique.

Le courant ionique global enregistré en fonction du potentiel et du temps est, suivant HODGKIN et HUXLEY (1952) égal à :

$$I_t = I_C + I_{Na} + I_K + I_L$$

I_C est le courant capacitif, I_{Na} le courant sodique, I_K le courant potassique, I_L le courant de fuite.

Analysant les courants sodique et potassique, HODGKIN et HUXLEY (1952) montrent que les ions Na^+ et K^+ traversent la membrane indépendamment les uns des autres suivant la différence de potentiel électrochimique ou "driving-force" à laquelle ils sont soumis : $(E - E_{Na})$, $(E - E_K)$ et en fonction de la perméabilité de la membrane, elle-même dépendant du potentiel de membrane et exprimée en termes de conductance g_{Na} et g_K, aboutissant ainsi aux relations :

$$I_{Na} = g_{Na} (E - E_{Na})$$

$$I_K = g_K (E - E_K)$$

E est le potentiel de membrane,
E_{Na} et E_K sont les potentiels d'équilibre du sodium et du potassium.
Ainsi, à partir de l'évolution des courants en fonction du potentiel et du temps, il est possible de déterminer les conductances membranaires.

HODGKIN et HUXLEY (1952) mettent ensuite en évidence que la conductance sodique g_{Na} est sous la dépendance de deux processus :

- un processus d'activation, représenté par la variable "m", qui augmente rapidement g_{Na} quand la membrane est dépolarisée ;

- un processus d'inactivation, représenté par la variable "h", qui inhibe lentement g_{Na} pendant cette dépolarisation.

La conductance potassique dépend d'une seule variable d'activation "n" qui augmente g_K lors des dépolarisations.
Ces trois variables "m", "h" et "n" sont fonction du potentiel et du temps et sont comprises entre zéro et un.

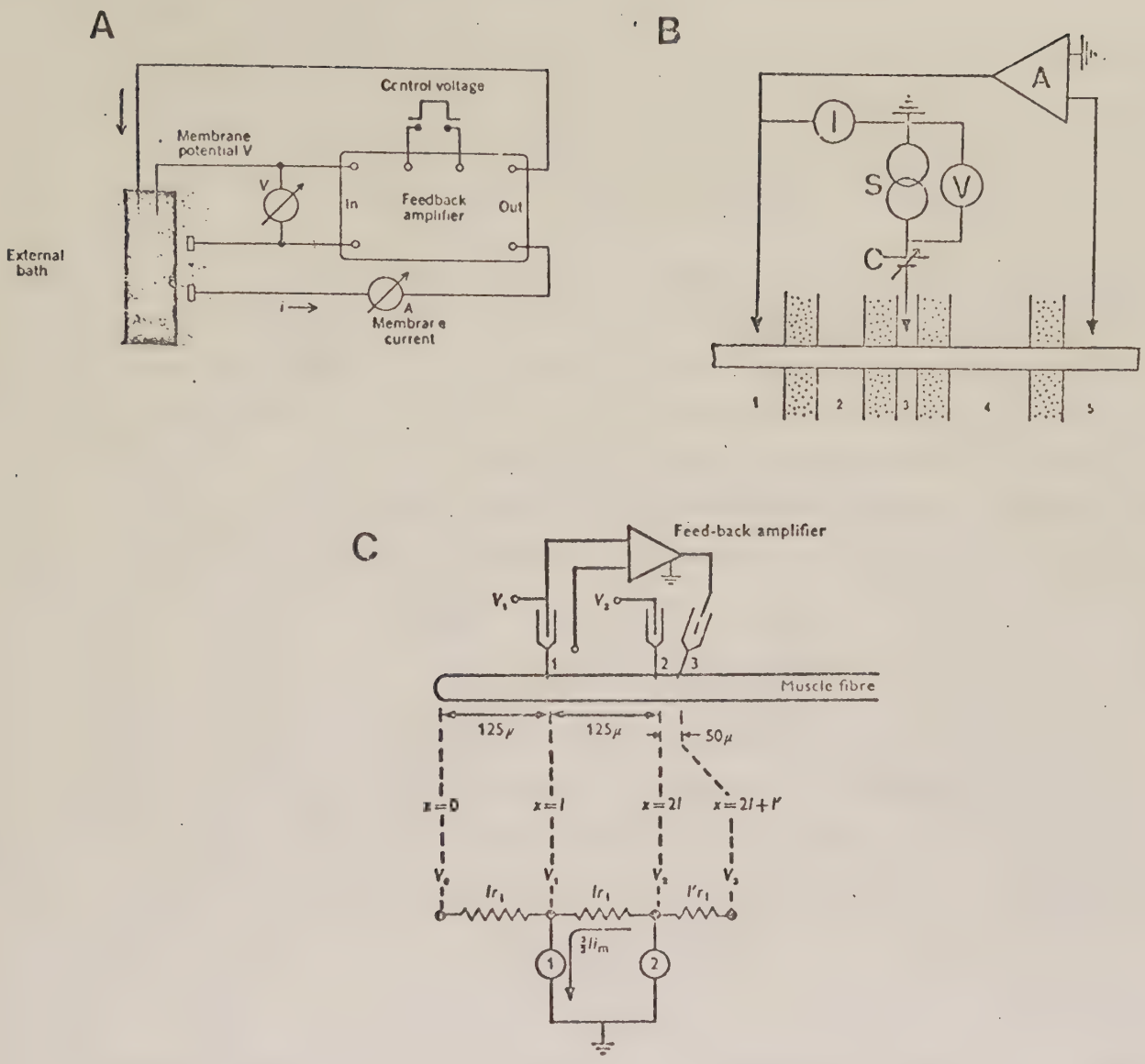


Figure 2 - Différentes techniques de potentiel imposé :

A - Contrôle du potentiel et mesure du courant par électrodes intracellulaires de grande surface d'après COLE, 1949 ; HODGKIN, HUXLEY et KATZ, 1952, dans "Nerve, muscle and synapse", KATZ, 1966.

B - Contrôle du potentiel et mesure du courant par électrodes externes (technique du double sucrose-gap) d'après ROUGIER, VASSORT et STÄMPFLI, 1968).

C - Contrôle du potentiel et mesure du courant par microélectrodes intracellulaires d'après ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN, 1970.

La figure 3 montre les variations de g_{Na} et g_K pendant un potentiel d'action propagé (HODGKIN et HUXLEY, 1952).

- Les variations de la conductance sodique pendant une dépolarisation sont aussi fonction d'une modification préalable du potentiel de membrane de telle façon qu'une prédépolarisation réduit le courant sodium alors qu'une préhyperpolarisation l'augmente (figure 4, HODGKIN et HUXLEY, 1952).

HODGKIN et HUXLEY (1952) supposent que le passage des ions est sous la dépendance de "sites" membranaires qui peuvent se trouver dans un état α, permettant le passage des ions ou dans un état β, ne le permettant pas. Si m, h et n représentent les proportions des sites dans l'état α, (1 - m), (1 - h) et (1 - n) sont les proportions des sites dans l'état β. Les variables m et h pour le sodium, n pour le potassium sont alors décrites par les relations suivantes :

$$dm/dt = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m$$

$$dh/dt = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h$$

$$dn/dt = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n$$

α_m, α_h et α_n sont les vitesses de conversion de l'état β vers α, β_m, β_h et β_n, les vitesses de conversion de l'état α vers β.

Les conductances sodique et potassique sont définies par les équations :

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na}\ m^3 h$$

$$g_K = \bar{g}_K\ n^4$$

dans lesquelles $\bar{g}_{Na}$ et $\bar{g}_K$ sont les conductances spécifiques maximum de la membrane.

NOBLE (1966) a donné les schémas résumant l'évolution des trois variables m, h et n qui déterminent les conductances sodique et potassique dans le cas de l'axone géant de Calmar (figures 5 et 6).

c) Application à la fibre musculaire striée de Batracien.

L'analyse des courants de membrane, en condition de potentiel imposé, de la fibre musculaire striée de Batracien a été réalisée :

- par ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1966, 1968, 1970 a et b) à l'aide de microélectrodes intracellulaires ;

- par ROUGIER, VASSORT et ILDEFONSE (1968), ILDEFONSE et ROUGIER (1968), ILDEFONSE (1970), ILDEFONSE et ROUGIER (1972),

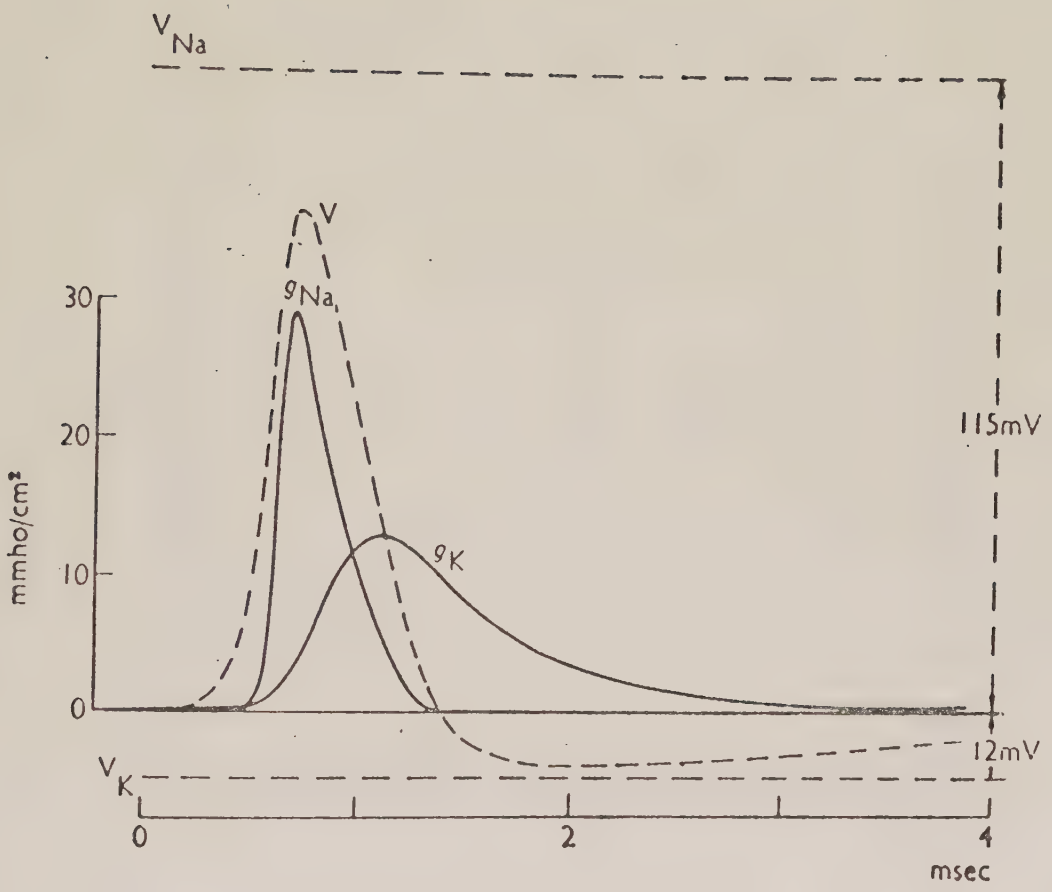


Figure 3 - Reconstruction théorique d'un potentiel d'action propagé (V) et des variations de conductance sodique (g_{Na}) et potassique (g_K).

(d'après HODGKIN et HUXLEY, 1952 ; dans KATZ, 1966).

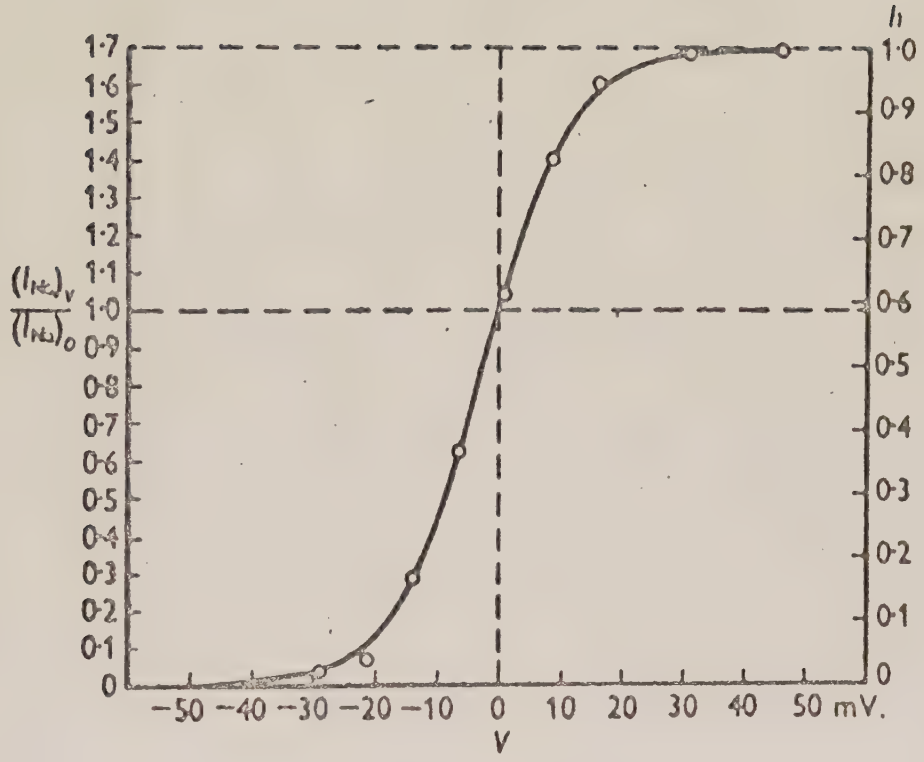


Figure 4 - Inactivation du courant sodium.

Relation h_∞ - potentiel obtenue sur l'axone géant de Calmar.

(HODGKIN et HUXLEY, 1952 c).

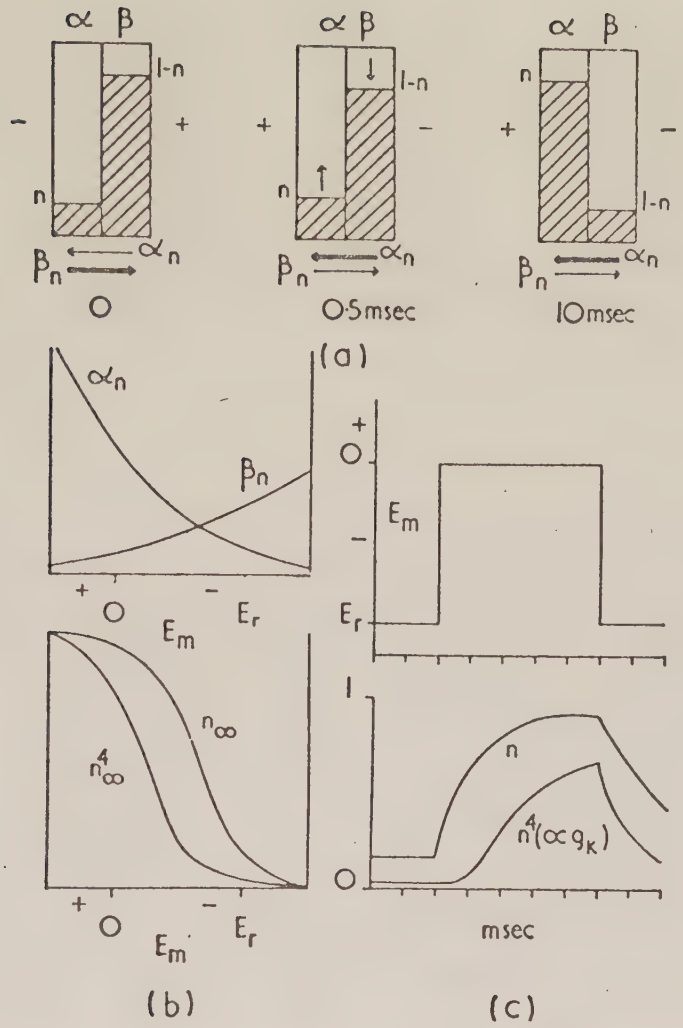


Figure 5 - Processus déterminant la conductance potassique dans la théorie de HODGKIN et HUXLEY.

a)- Evolution de n lors d'une dépolarisation brusque : la fraction n de groupes dans l'état α, initialement faible (α_n est petit, β_n est grand) augmente exponentiellement par suite de l'augmentation de α_n et de la diminution de β_n par la dépolarisation. La grandeur relative des coefficients α et β est indiquée par l'épaisseur des flèches.

b)- Partie supérieure : variations des constantes de vitesse en fonction de E_M (E_r = potentiel de repos).

Partie inférieure : variations de n_∞ ($n_\infty = \alpha_n / \alpha_n + \beta_n$) et n_∞^4 en fonction de E_M

c)- Evolution de n et g_K lors d'une dépolarisation brusque.

(NOBLE, 1966).

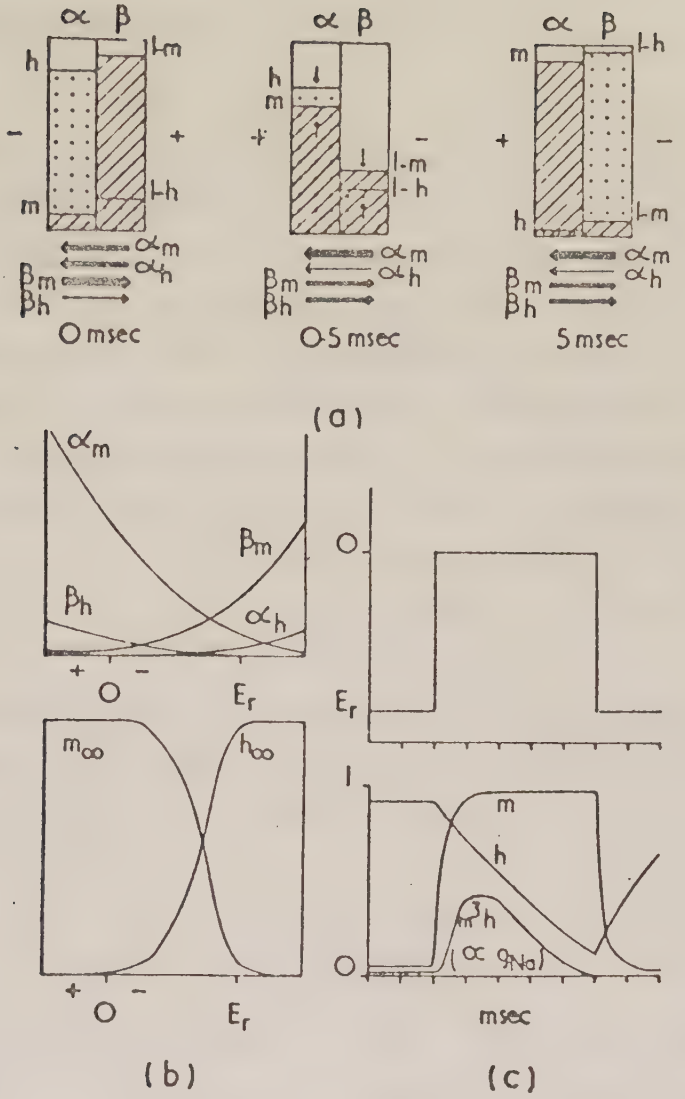


Figure 6 - Processus déterminant la conductance sodique dans la théorie de HODGKIN et HUXLEY.

a)- Evolution de m et h lors d'une dépolarisation brusque. Initialement, m est petit et h grand ; lors d'une dépolarisation α_m devient très grand et m augmente ainsi rapidement ; β_h est également augmenté mais, puisqu'il est plus petit que α_m, h ne diminue que lorsque m a atteint sa valeur presque maximale. La grandeur relative des coefficients α_m, β_m, α_h et β_h est indiquée par l'épaisseur des flèches.

b)- Partie supérieure : variations des constantes de vitesse en fonction du potentiel.

Partie inférieure : variations de m_∞ et h_∞ en fonction du potentiel.

c)- Evolution de m, h et g_{Na} lors d'une dépolarisation brusque.

(NOBLE , 1966)

sur fibre isolée, au moyen de la technique de double séparation de saccharose (double sucrose-gap). Les principaux résultats de ces deux ensembles de travaux sont résumés séparément.

La méthode utilisée par ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN nécessite l'implantation, effectuée à l'extrémité d'une fibre du muscle couturier de Grenouille, de trois microélectrodes, l'une délivrant le courant, les deux autres permettant la mesure du potentiel et du courant de membrane. La plupart des expériences sont réalisées en solution de Ringer hypertonique afin de supprimer la contraction qui rendrait difficile le maintien en place des électrodes. Cette méthode qui convient parfaitement à l'étude des courants retardés est moins satisfaisante pour l'analyse des courants rapides que la technique de "double sucrose-gap": les auteurs sont conduits, pour cette raison, à expérimenter à basse température, entre 0° et 4°C, afin de mieux séparer les courants de cinétique rapide. Ces auteurs ont mis en évidence :

- un courant entrant, précoce et transitoire, supprimé par la tétrodotoxine (TTX), qui s'inverse pour un potentiel de +20 mV, valeur en accord avec le potentiel d'équilibre du sodium en milieu hypertonique : ce courant est de nature sodique.

- un courant sortant retardé dont le potentiel d'équilibre est de -85 mV : ce courant est transporté par ions potassium.

A l'inverse de ce que l'on observe sur l'axone géant de Calmar, le courant retardé n'est pas maintenu pendant une dépolarisation prolongée mais inactivé comme le courant initial.

Le potentiel d'équilibre du courant retardé varie avec la concentration externe en potassium; de plus, il n'est pas égal au potentiel d'équilibre du potassium : le "canal potassium" serait en effet moins sélectif vis à vis du sodium en condition de potentiel imposé ($P_{Na} / P_K = 0,03$) que la membrane au repos ($P_{Na} / P_K = 0,01$). Les valeurs du potentiel d'équilibre du courant retardé doivent d'ailleurs probablement être modifiées si on tient compte des courants tubulaires (ADRIAN et PEACHEY, 1973).

ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970, b) montrent d'autre part que le courant potassium peut être divisé en trois composantes auxquelles correspondent des voies de passage différentes :

- un canal responsable de la rectification retardée, semblable à celui

du nerf mais s'inactivant plus rapidement et complètement ;

- un canal dans lequel la dépolarisation augmente la conductance potassium g_K mais à une vitesse beaucoup plus lente que dans le canal précédent ;

- un canal dit "inward rectifier" dans lequel le courant diminue avec une constante de temps de 0, 25 sec pour une hyperpolarisation à -150 mV.

Les auteurs mentionnent de plus l'existence d'un quatrième canal où doit se faire le transport actif de potassium.

Le premier canal est responsable de la repolarisation rapide pendant la phase descendante du potentiel d'action et du potentiel consécutif précoce ; le deuxième donne naissance aux potentiels consécutifs tardifs alors que le troisième est responsable de la lente hyperpolarisation (phénomène de "creep") observée par ADRIAN et FREYGANG (1962). Le canal dit de rectification retardée se situerait principalement au niveau de la membrane de surface et les deux autres dans le système tubulaire transverse.

Les auteurs utilisant la technique de double séparation de saccharose ont mis principalement en évidence :

- un courant capacitif évoluant de façon exponentielle en deux phases : une phase rapide dont la constante de temps est de 0, 015 ms et une phase lente de constante de temps égale à 0, 37 ms.

- un courant initial entrant qui s'inverse pour une dépolarisation de + 130 mV ; la valeur du potentiel d'inversion est très proche de E_{Na}, potentiel d'équilibre du sodium. Ce courant est supprimé par la tétrodotoxine (TTX) ; il est de nature sodique.

- un courant sortant retardé, activé pour une dépolarisation de + 40 mV ; le potentiel d'équilibre de ce courant est très proche de E_K, potentiel d'équilibre du potassium. Ce courant est diminué par le tétraéthylammonium (TEA), inhibiteur de la perméabilité membranaire au potassium ; il est de nature potassique. L'activation et l'inactivation du courant retardé seraient fonction de la concentration en potassium des tubules transverses.

- un courant dynamique entrant se développant lorsque des hyperpolarisations sont imposées à la membrane ; ce courant, supprimé par le tetraéthylammonium (TEA), est de nature potassique.

ILDEFONSE, PAGER et ROUGIER (1969) et ILDEFONSE(1970) ont réalisé une étude électrophysiologique de fibres détubulées ; leurs

résultats sont présentés ultérieurement (Historique : chapitre II ; Résultats : chapitre III).

II - STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE.

La fibre musculaire striée présente une structure complexe par suite de l'existence de deux systèmes membranaires : le réticulum sarcoplasmique et le système tubulaire transverse.

Le réticulum sarcoplasmique est une formation intracellulaire constituée par les tubules longitudinaux et les citernes terminales.

Le système tubulaire transverse ou encore système T est observé en 1902 par VERATTI ; retrouvé en microscopie électronique par PORTER et PALADE (1957), il est décrit par ces auteurs comme des vésicules situées entre les citernes terminales du réticulum et par suite appelées "vésicules intermédiaires" ; ils considéraient, en effet, le système T comme faisant partie du réticulum sarcoplasmique.

En fait, des études ultérieures en microscopie électronique ont montré que les tubules transverses sont des invaginations de la membrane plasmique de surface et qu'ils s'ouvrent sur le milieu extracellulaire puisqu'il est possible à de grosses molécules telles que la ferritine (HUXLEY, 1964 ; PAGE, 1964) ou des colorants fluorescents (ENDO, 1966) de pénétrer dans la lumière tubulaire.

PEACHEY (1965) évalue à 7 le rapport de la surface de la membrane tubulaire à celle de la membrane externe ; le volume représenté par les tubules serait égal à 0, 3 % de celui de la fibre.

Les tubules transverses sont, chez la Grenouille, situés au niveau des stries Z ; ils constituent, avec les citernes terminales du réticulum, les "triades" décrites par PEACHEY en 1965 (figure 7) puis par FRANZINI-ARMSTRONG (1968, 1970, 1971).

III - ROLE DU SYSTEME TUBULAIRE TRANSVERSE.

L'activation mécanique totale du système contractile, produite très peu de temps après le potentiel d'action, avait permis à A. V. HILL, dès 1949, de conclure qu'elle ne saurait être due à la diffusion d'une substance libérée au niveau de la membrane de surface lors

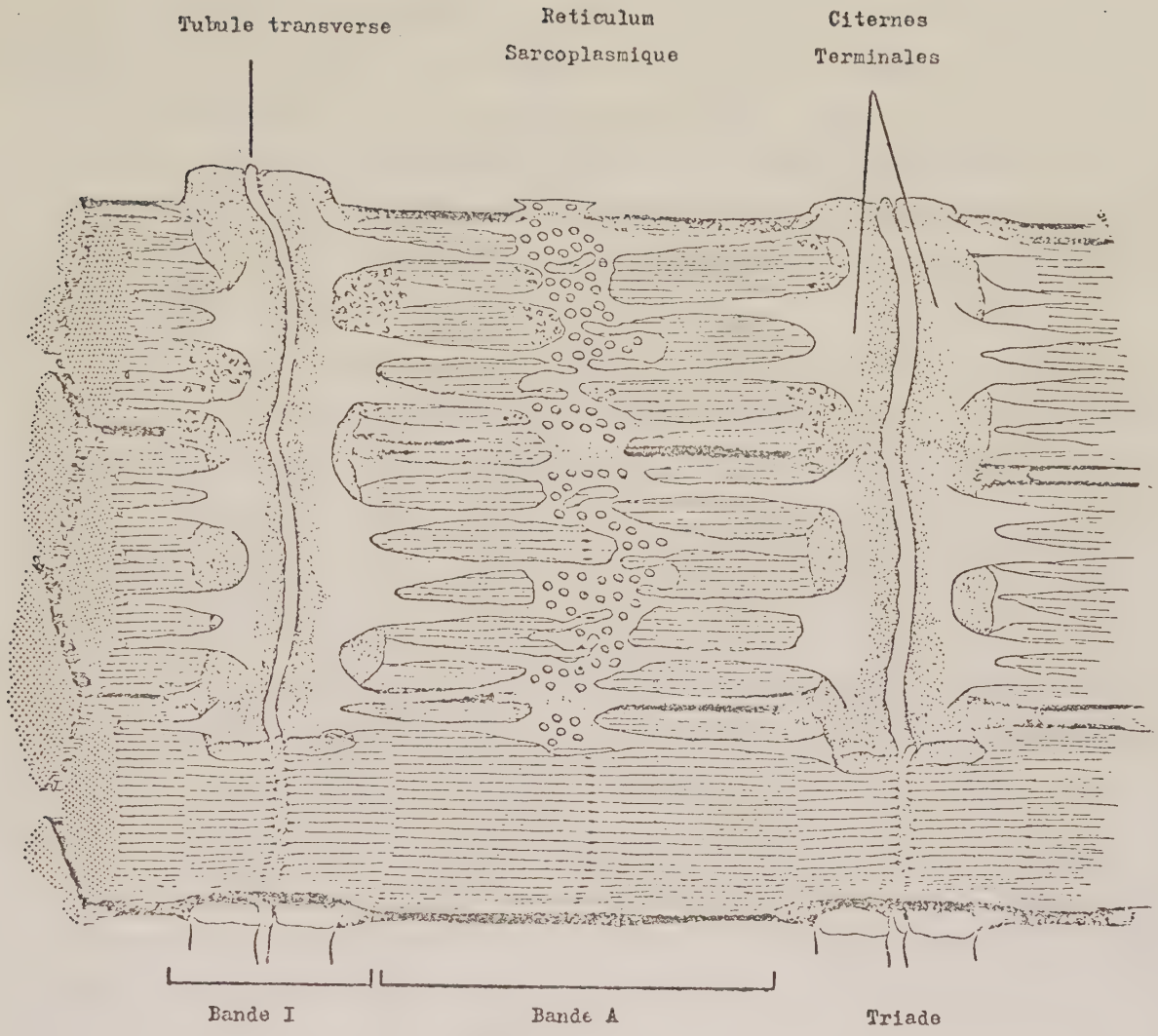


Figure 7 - Reconstitution trimensionnelle du reticulum membranaire.

(PEACHEY, 1965)

de l'excitation. Le problème de la nature du signal commandant l'activation mécanique était dès lors posé.

Depuis, les expériences de HUXLEY et TAYLOR (1958) ont montré que des dépolarisations en un point de la membrane de surface peuvent provoquer des contractions localisées lorsqu'elles sont appliquées très précisément au niveau des stries Z. Les auteurs concluent que le système tubulaire transverse doit jouer un rôle prépondérant dans la propagation de la dépolarisation de surface entraînant l'activation du mécanisme contractile. Aussi de nombreuses recherches ont été consacrées à l'étude de cette structure.

Il est apparu que ce système est non seulement un élément essentiel du couplage excitation-contraction mais qu'il est aussi responsable de phénomènes électriques propres à la fibre musculaire striée.

KATZ (1950) supposait que la valeur élevée de la capacité membranaire ne pouvait être expliquée que par une sous-estimation de la surface réelle de la membrane.

En 1964, FALK et FATT mettent en évidence l'existence de deux capacités distinctes, l'une de 2,6 $\mu F/cm^2$ attribuée à la membrane externe, l'autre de 4,1 $\mu F/cm^2$ au système T.

HODGKIN et HOROWICZ (1960) expliquent la lente repolarisation de la membrane, après une dépolarisation par le potassium, par une accumulation de cet ion dans les tubules transverses et situent les perméabilités au chlore et au potassium respectivement au niveau de la membrane de surface et de la paroi tubulaire.

Le phénomène de "creep" c'est à dire le lent accroissement du potentiel sous l'effet d'un courant hyperpolarisant serait dû à une diminution de la concentration potassique dans la lumière des tubules (ADRIAN et FREYGANG, 1962).

Le potentiel consécutif tardif ("late after-potential") qui suit une période d'activité répétée serait la conséquence d'une accumulation de potassium dans les tubules (FREYGANG, GOLDSTEIN et HELLAM, 1964a ; FREYGANG, GOLDSTEIN, HELLAM et PEACHEY, 1964b). En ce qui concerne le potentiel consécutif proprement dit, PERSSON (1963) montre qu'il ne peut être interprété comme résultant d'une telle accumulation.

Le rôle du système tubulaire transverse dans le couplage

excitation-contraction ainsi que la relation supposée entre certaines caractéristiques électriques de la fibre musculaire striée et l'existence de cette structure ont été particulièrement bien mis en évidence par un ensemble de travaux réalisés sur des fibres dont le système T est sélectivement détruit par choc osmotique.

HOWELL et JENDEN (1967), HOWELL (1969) rapportent que des muscles placés pendant une heure dans une solution de Ringer additionnée de 400 mM de glycérol, présentent de profondes altérations du système tubulaire transverse ; ils observent de plus que ces muscles ne répondent mécaniquement ni à une stimulation électrique ni à une dépolarisation par le potassium.

EISENBERG et EISENBERG (1968) présentent une étude morphologique détaillée de fibres détubulées suivant la méthode de HOWELL et JENDEN.

Le même procédé permet à EISENBERG et GAGE (1967, 1969) et GAGE et EISENBERG (1967, 1969a et b) d'étudier les propriétés électrophysiologiques de fibres dont le système T est virtuellement absent.

Ils mesurent les capacités membranaires de fibres intactes et de fibres détubulées et donnent les valeurs de 2, 1 $\mu F/cm^2$ pour la membrane externe et 4 $\mu F/cm^2$ pour celle des tubules.

Ils déterminent les conductances au potassium et au chlore des membranes externe et tubulaire. D'après leurs résultats, la conductance chlore est strictement localisée au niveau de la membrane de surface, la conductance potassium est répartie entre la membrane externe (28 $\mu mhos/cm^2$) et la membrane tubulaire (55 $\mu mhos/cm^2$). L'absence de conductance chlore au niveau de la paroi tubulaire est discutée. En effet, COSTANTIN et PODOLSKY (1967) ont montré que l'application intracellulaire d'ions chlore produit des contractions de fibres "pelées", fibres dont la membrane plasmique a été enlevée. Donc, si la membrane tubulaire elle-même était imperméable au chlore, l'application de chlore ne changerait pas le potentiel à travers la paroi du tubule et ainsi ne provoquerait pas de contraction. Par contre, si cette membrane est perméable à cet ion et que l'apparente absence de conductance chlore à ce niveau soit causée par la présence de charges négatives fixes dans la lumière tubulaire (RAPOPORT, FREYGANG et PEACHEY, 1968 ; RAPOPORT, 1969), le chlore pourrait changer le potentiel à travers la membrane provoquant ainsi la contraction. La conductance potassique tubulaire se

situerait essentiellement dans la partie de la membrane qui n'est pas recouverte par le réticulum sarcoplasmique (environ 27%, PEACHEY, 1965).

Enfin, GAGE et EISENBERG notent l'absence de réponse mécanique, la disparition du potentiel consécutif, du potentiel consécutif tardif de même que du lent accroissement du potentiel produit par un courant hyperpolarisant (phénomène de "creep").

ILDEFONSE (1970) note également l'absence de potentiel consécutif ainsi que la diminution du potentiel de membrane au repos déjà indiquée par GAGE et EISENBERG (1969a) et HOWELL (1969). L'analyse des courants de membrane montre la disparition de la composante capacitive attribuée à la membrane des tubules et l'absence de rectification retardée ; le courant initial sodique présente les mêmes caractéristiques que celui de fibres non traitées ; l'absence de chlorure dans le milieu extracellulaire permet d'observer le phénomène de rectification anormale.

HENDERSON (1970) remarque que l'utilisation successive de solutions de Ringer glycérolé puis de Ringer normal de lavage, à 8°C, empêche la dépolarisation et la disparition du potentiel consécutif, de plus, il mentionne que les changements induits par le glycérol, à l'exception de la perte de réponse mécanique, sont réversibles et suppose, par suite, que le mécanisme responsable du potentiel consécutif est situé au niveau de la membrane de surface.

ZACHAR, ZACHAROVA et ADRIAN (1972) observent une réversibilité de la dépolarisation, des changements morphologiques et du découplage mécanique sous l'effet d'une réexposition au glycérol à condition que la concentration initiale de ce dernier n'ait pas été supérieure à 150 mM ; pour des concentrations de départ plus élevées, dépolarisation et changements morphologiques peuvent être réversibles mais non le découplage mécanique.

De même, DULHUNTY et GAGE (1973) indiquent que chez le Crapaud, la réduction de la capacité membranaire causée par un traitement classique au glycérol (400 mM pendant une heure), peut être réversible si les fibres sont replacées en Ringer glycérolé peu de temps après le lavage en Ringer normal ; par contre, la lésion du couplage excitation-contraction est essentiellement irréversible.

KROLENKO et FEDOROV (1972) observent une réapparition de la réponse mécanique après des temps variables et lorsque le glycérol

a été utilisé à des concentrations allant de 110 à 220 mM, ce qui suppose une réversibilité des altérations morphologiques produites par ce traitement.

HODGKIN et NAKAJIMA (1972a et b) déterminent les constantes électriques de la fibre musculaire par l'analyse des propriétés de câble à basse fréquence et établissent une relation entre la capacité et la conductance de membrane et le diamètre de la fibre ; ils donnent les valeurs de 4,6 $\mu F/cm^2$ et 0,21 $mmho/cm^2$ pour un diamètre de 50 μm et 8,5 $\mu F/cm^2$ et 0,37 $mmho/cm^2$ pour un diamètre de 130 μm. Ainsi, comme l'avaient déjà indiqué FALK et FATT (1964), GAGE et EISENBERG (1969), la capacité membranaire mesurée à la surface de la membrane présente une importante composante tubulaire.

La capacité efficace à haute fréquence mesurée à partir de la vitesse de conduction et de la constante de temps à la base du potentiel d'action est de 2,6 $\mu F/cm^2$ pour des fibres normales et de 0,9 $\mu F/cm^2$ pour des fibres détubulées.

Ces résultats sont en accord avec le modèle théorique proposé par ADRIAN CHANDLER et HODGKIN (1969) qui attribuent à la membrane de surface et à la membrane tubulaire une capacité de 1 $\mu F/cm^2$. Cette valeur est aussi rapportée par PEACHEY et ADRIAN (1973).

Données expérimentales et théoriques en faveur de l'hypothèse d'une membrane tubulaire excitable.

La propagation, le long de la membrane tubulaire, de la dépolarisation de surface responsable de l'activation du mécanisme contractile a été d'abord considérée comme purement électrotonique. Cependant, il est possible d'envisager l'existence d'un processus régénératif au niveau de la membrane des tubules comme le suggèrent divers auteurs.

Si HUXLEY et TAYLOR (1958) observaient seulement une propagation graduée de la contraction par application de dépolarisations croissantes et ponctuelles de la membrane de surface, les résultats de GONZALES-SERRATOS (1966, 1971) montrant que la vitesse de propagation radiale de l'activation dépend de la température avec un Q_{10} égal à 2, sont compatibles avec l'existence d'un signal propagé le long du système T.

Sur des fibres "pelées" c'est à dire dont le sarcolemme est enlevé, COSTANTIN et PODOLSKY (1967) observent quelques réponses de type "tout ou rien".

Un argument indirect est apporté par ADRIAN, COSTANTIN et PEACHEY (1969) : ces auteurs montrent que les myofibrilles centrales d'une fibre dont l'activité propagée est abolie par la tétrodotoxine, ne peuvent se contracter que si les potentiels d'action utilisés comme signaux de commande en condition de potentiel imposé et à la température de la pièce, ont une amplitude normale ; ainsi, si la propagation de la dépolarisation le long des tubules est passive, le facteur de sécurité qui permet au potentiel d'action de la membrane de surface d'activer l'ensemble des myofibrilles est petit. D'autre part, étudiant la propagation radiale de la contraction lorsque de longues impulsions dépolarisantes sont appliquées à la surface de la fibre, ils notent que les valeurs de la constante d'espace tubulaire (λ T) calculées à partir de leurs mesures de seuil de contraction des myofibrilles superficielles et axiales ne sont pas en accord avec les valeurs théoriques d'un modèle tubulaire passif ; ils suggèrent l'existence d'une rectification retardée au niveau des tubules.

Ces expériences étant réalisées en présence de tétrodotoxine, l'existence d'une augmentation régénérative de conductance au sodium dans le système T ne pouvait être écartée. Ceci conduit COSTANTIN (1970) à reprendre cette étude, suivant le même protocole expérimental, sur des fibres placées en solution ne contenant que 50% de chlorure de sodium et dépourvue de tétrodotoxine. Les valeurs de la constante d'espace trouvées dans ces conditions sont nettement plus élevées que celles obtenues par les précédents auteurs. Observant que l'addition de tétrodotoxine aux solutions appauvries en sodium ou une très forte réduction de la concentration sodique réduisent également la propagation de la contraction, il pense avoir là une preuve qu'un courant sodium entrant se développe au niveau de la membrane tubulaire.

L'hypothèse d'une membrane tubulaire excitable permet à BEZANILLA, CAPUTO, GONZALES-SERRATOS et VENOSA (1972) d'expliquer la chute de tension tétanique observée sur des fibres placées en solution appauvrie en sodium et attribuée à une inactivation des myofibrilles axiales : phénomène dont ne peut rendre compte la seule diminution d'amplitude du potentiel d'action de surface dans le cadre d'une propagation électrotonique puisqu'il n'est pas observé en Ringer normal bien que le potentiel d'action soit diminué par la haute fréquence de stimulation tétanique mais qui pourrait être expliqué par une diminution importante de la concentration en sodium des tubules en supposant un accroissement régénératif de la conductance sodique à ce niveau.

Une autre approche expérimentale est proposée par CAPUTO et DIPOLO (1973) avec l'utilisation de solutions dont la viscosité est augmentée par addition de Dextrane : dans ces conditions, le rétablissement d'une secousse d'amplitude normale qui avait été momentanément abolie par une solution sans sodium, intervient avec un délai ; l'inactivation des myofibrilles centrales immédiatement après le retour en solution de Ringer-Dextrane expliquant les réponses intermédiaires plus petites observées.

VAUGHAN, HOWELL et EISENBERG (1972) observent que des fibres dont la capacité tubulaire est très fortement réduite par des solutions de faible force ionique sont capables de donner des réponses électriques et contractiles normales et pensent pouvoir interpréter ce résultat en invoquant un mécanisme du type "potentiel d'action" au niveau de la membrane tubulaire.

Cependant, l'analyse théorique du changement de capacité tubulaire, tenant compte des modifications morphologiques du système T induites par la diminution de force ionique, n'est pas en accord avec les données expérimentales (EISENBERG, VAUGHAN et HOWELL, 1972) : les courbes théoriques montrent en effet une augmentation notable de la capacité. Une explication est proposée aux résultats expérimentaux de VAUGHAN, HOWELL et EISENBERG (1972) : puisque peu de courant pénètre dans les tubules comme le montrent les mesures de capacité, il serait possible que la résistance qui s'oppose au passage du courant ne soit pas celle de la lumière tubulaire mais une résistance située à l'ouverture des tubules dite "acess resistance". Cette résistance augmenterait en présence de solutions de faible force ionique.

L'analyse théorique d' EISENBERG, VAUGHAN et HOWELL était réalisée en supposant que la membrane tubulaire est représentée comme un ensemble de résistances et de capacités en parallèle distribuées le long de la résistance de la lumière tubulaire ("distributed model") . Ce modèle, s'il ne rend pas compte des résultats expérimentaux de VAUGHAN, HOWELL et EISENBERG (1972) est par contre en accord avec les résultats d' ADRIAN, COSTANTIN et PEACHEY (1969) qui observent que la diminution de force ionique du milieu ne change pas la propagation radiale de la contraction.

BASTIAN et NAKAJIMA (1974) concluent de leurs expériences à la nécessité d'un potentiel d'action dépendant du sodium dans le système T et contribuant, dans une proportion de 70%, à la génèse d'une réponse

contractile normale à la température de la pièce : en effet, les amplitudes de la secousse et du tétanos enregistrés sur des fibres dont l'activité propagée est abolie par la tétrodotoxine ou l'absence de sodium et auxquelles on impose leurs propres potentiels d'action, sont toujours inférieures à celles de réponses à un potentiel d'action propagé. A basse température, l'excitabilité de la membrane tubulaire semble moins nécessaire à la complète activation de la contraction.

ADRIAN et PEACHEY (1973) proposent un modèle suivant lequel le décours et la vitesse de la phase ascendante de potentiels d'action calculés sont très proches des potentiels obtenus expérimentalement si l'on fait intervenir une résistance d'accès séparant le liquide extracellulaire de la lumière des tubules transverses, et des courants sodium et potassium activables au niveau de la membrane des tubules.

Ce modèle prévoit l'apparition d'un ressaut de dépolarisation pendant le décours du potentiel consécutif ("humped after potential") ; ce ressaut, fréquemment observé expérimentalement, dépendrait notamment du diamètre de la fibre.

MATERIEL ET METHODES

I PREPARATION BIOLOGIQUE

II SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES

III METHODES D'ENREGISTREMENT

1) Technique de la double séparation de saccharose.

2) Cuve d'expérimentation.

3) Electrodes externes.

4) Montage de la préparation dans la cuve.

5) Obtention et montage des fibres détubulées.

6) Dispositif électronique.

   a) Circuit de mesure en courant imposé.

   b) Circuit de mesure en potentiel imposé.

7) Conditions générales d'expérimentation.

I - PREPARATION BIOLOGIQUE.

Les expériences ont été réalisées sur des fibres musculaires squelettiques rapides isolées du muscle semi-tendineux de Grenouille (Rana esculenta, Rana dalmatina) ou de Rainette (Hyla arborea).

Le muscle semi-tendineux est situé dans la partie interne de la cuisse; il est composé de deux masses, en forme de fuseau, réunies par un tendon s'insérant sur le tibia.

Après prélèvement, le muscle est placé dans une cuve contenant de la solution de Ringer et fixé par ses trois tendons ; le tendon commun est sectionné longitudinalement afin de séparer les deux masses musculaires. L'une, après ligature des tendons par un fil fin de quelques centimètres de longueur, est transportée puis attachée dans la cuve à dissection remplie de liquide physiologique ; l'autre peut être conservée au froid dans un grand volume de Ringer pour une dissection ultérieure.

La cuve à dissection (figure 8) présente deux compartiments A et B ; l'isolement d'une ou parfois deux fibres s'effectue dans le compartiment A. La fibre isolée est ensuite détachée des tiges mobiles a et b par section transversale des tendons, placée dans le compartiment B puis transportée dans la cuve d'expérimentation sur un morceau de coton enroulé autour d'une pince fine et imbibé de solution physiologique.

II - SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES.

Les solutions sont, dans la plupart des cas, refroidies en permanence (8 à 12°C) pendant l'expérience. La température du laboratoire n'excède pas 20°C.

- La solution physiologique normale ou Ringer normal a la composition suivante :

NaCl	111 mM/l
KCl	1,8 mM/l
$CaCl_2$	1,8 mM/l
$NaHCO_3$	2,3 mM/l

- La solution isotonique de résistance élevée est préparée avec du saccharose ou du mannitol à la concentration de 210 mM/l.

Figure 8 - Cuve à dissection.

- Le glycérol est ajouté au Ringer normal à la concentration de 400 mM/l. La solution de Ringer utilisée immédiatement après est enrichie en $CaCl_2$ (5 mM/l) et additionnée de $MgCl_2$ (5 mM/l), (EISENBERG, HOWELL et VAUGHAN, 1971).

- Des substances telles que la tétrodotoxine (TTX), le chlorure de tetraéthylammonium (TEA), le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) et le dextrane ont été utilisées aux concentrations suivantes :

TTX	10^{-7} et 10^{-8} g/l
TEA	20 mM/l
$MnCl_2$	2 et 4 mM/l
Dextrane	15 g/ 100 ml

- Les solutions sans sodium sont préparées en substituant au chlorure de sodium une quantité équimoléculaire de chlorure de choline. Pour les solutions appauvries en sodium, le chlorure de choline ou le mannitol ont été utilisés.

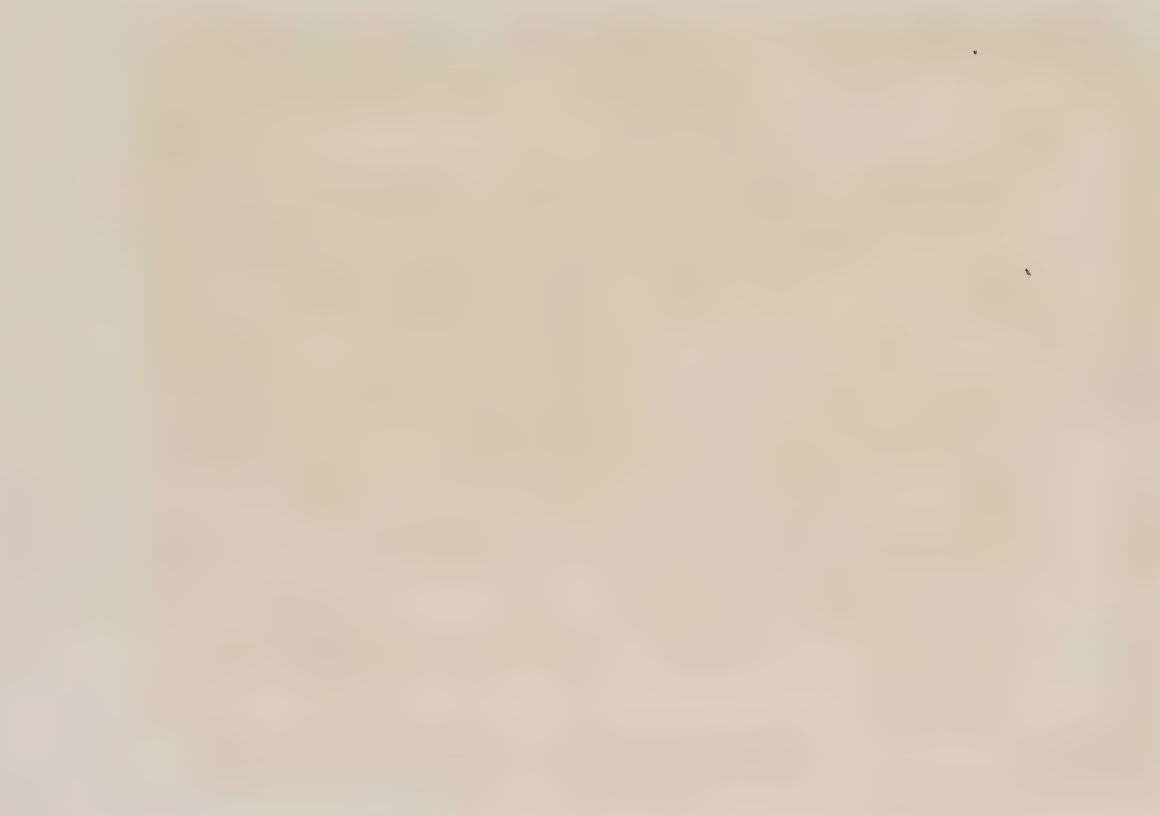
III - METHODES D' ENREGISTREMENT.

1) Technique de la double séparation de saccharose (double sucrose-gap).

Cette technique a été mise au point par STÄMPFLI (1954) et utilisée d'abord pour l'étude de la membrane du noeud de Ranvier. KÖNIG (1962), STÄMPFLI (1963) et ROUGIER (1964) l'ont ensuite adaptée à l'étude de la membrane de la fibre musculaire.

Le très grand intérêt de cette technique est de permettre la mesure des variations de potentiel en vraie grandeur tout en utilisant des électrodes externes.

En effet, la méthode d'enregistrement par microélectrodes intracellulaires (LING et GERARD, 1949) très largement utilisée dans le cas de la fibre musculaire ne peut servir à l'étude de structure comme la membrane nodale. Par ailleurs, l'utilisation classique d'électrodes externes conduit à des mesures très inférieures aux valeurs réelles car le potentiel entre deux points A et B (figure 9) dépend, dans ces conditions, du rapport des résistances extracellulaire R_e et intracellulaire R_i :



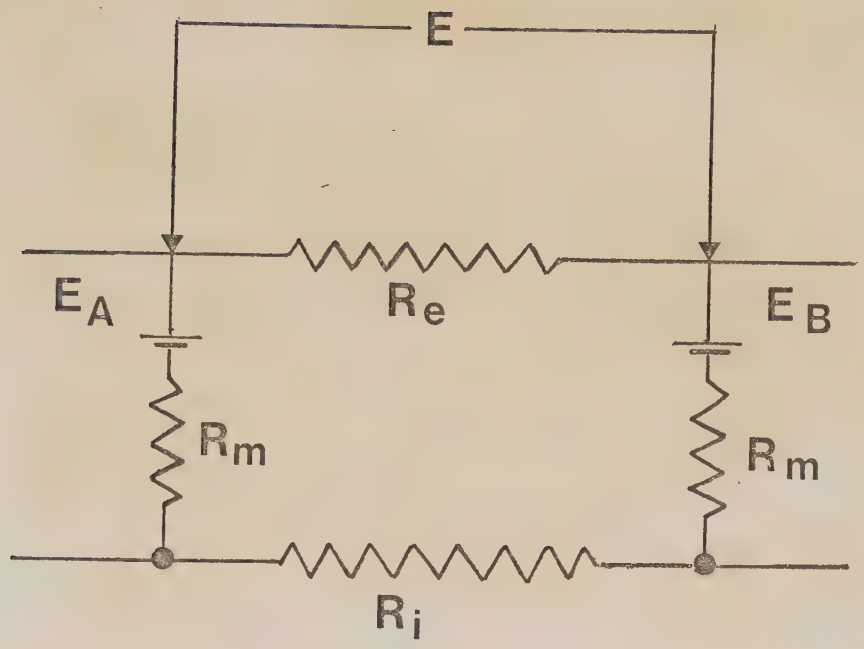


Figure 9 - Enregistrement du potentiel par électrodes externes.

$$E = EA - EB\left(\frac{R_e}{R_e + R_i}\right)$$

Or, R_e a normalement une valeur faible. Si, par contre, R_e est très grand devant R_i, le rapport $\frac{R_e}{R_e + R_i}$ tend vers 1 et les valeurs mesurées sont très proches des valeurs réelles. C'est ce que permet de réaliser la méthode présentée par STÄMPFLI.

La résistance extracellulaire R_e est rendue artificiellement très grande en lavant, en permanence, avec une solution isotonique de saccharose, une (simple sucrose-gap) ou deux portions de la préparation (double sucrose-gap) : le double "sucrose-gap" permet de créer sur la fibre musculaire un étranglement de Ranvier artificiel qui sera la portion de membrane au niveau de laquelle seront étudiés les variations de potentiel et les courants ioniques respectivement en courant et en potentiel imposés.

2) Cuve d'expérimentation.

Elle présente cinq compartiments (figure 10) réalisés de la façon suivante :

Deux petites cuves en altuglass de cinq centimètres de longueur constituent les compartiments latéraux A et B. Trois tuyaux en matière plastique, de 3 mm de diamètre, sont serrés et collés entre les cuves sur une longueur d'un centimètre ; leur largeur totale est ainsi ramenée à environ 1,5 mm. Trois encoches de forme ovale sont ensuite pratiquées, sur une profondeur de 1 mm, ouvrant ainsi les compartiments a, b et c. Les compartiments a et c dans lesquels circule la solution isotonique de saccharose, ont une largeur de 300 μm ; dans le compartiment central b ou compartiment test, un peu plus étroit (250 μm) où se trouve la portion de fibre étudiée, circulent les solutions physiologiques normales ou modifiées. Les compartiments latéraux A et B sont remplis soit de Ringer normal soit d'une solution de chlorure de potassium isotonique.

Un robinet (KILB et STÄMPFLI, 1955) situé dans le prolongement du tuyau b permet d'effectuer les changements de solutions.

Le refroidissement des solutions est assuré par un bac de lucoflex rempli de glace dans lequel plongent les catheters qui relient les tuyaux a, b et c aux réservoirs de solutions.

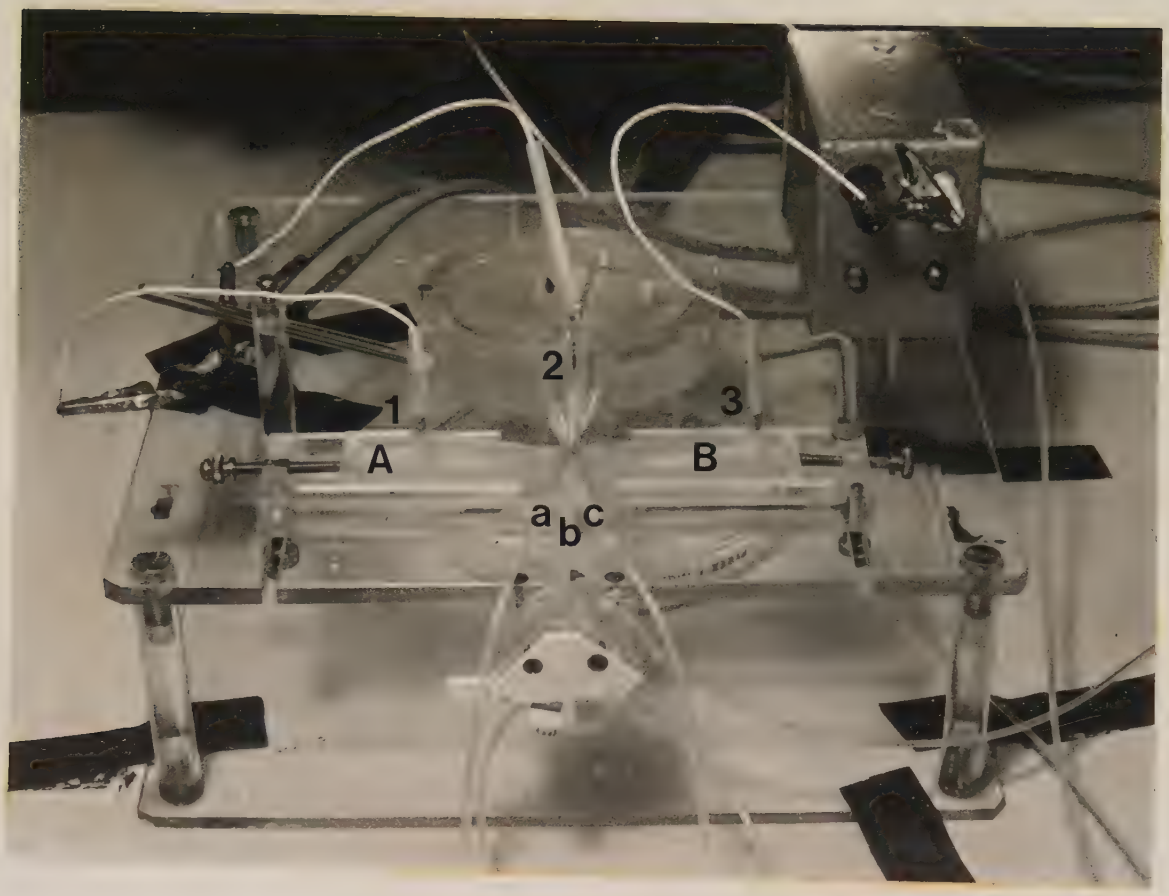


Figure 10 - Dispositif expérimental montrant :

- la cuve d'expérimentation,
- les électrodes (1, 2 et 3),
- le robinet permettant les changements de solutions.

3) Electrodes externes

Chaque électrode est constituée par un cylindre métallique de 2 mm de longueur, agrégat de poudre d'argent et de chlorure d'argent traversé par un fil d'argent, et par un pont d'Agar-KCl isotonique, introduits dans un catheter long d'environ 2 cm.

Deux électrodes plongent dans les compartiments latéraux A et B ; la troisième est placée dans le prolongement du tuyau central b, à une faible distance de l'ouverture pratiquée dans celui-ci.

4) Montage de la préparation dans la cuve d'expérimentation.

Une première cloison de vaseline est posée autour de chacune des encoches a, b et c. La fibre est alors glissée à l'intérieur des trois ouvertures, les extrémités reposant dans les compartiments latéraux A et B. Une deuxième cloison est alors posée au-dessus de la première afin d'assurer une bonne étanchéité de chaque compartiment.

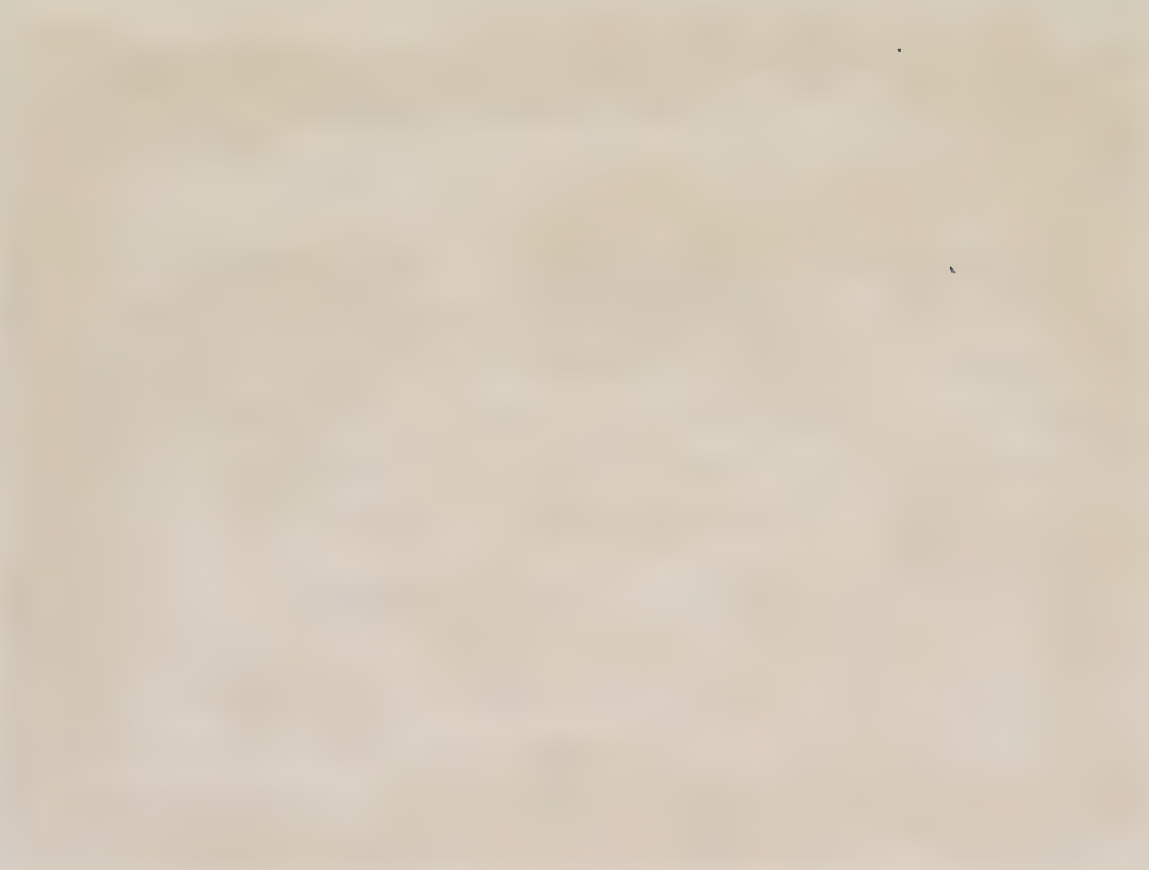
5) Obtention et montage des fibres détubulées.

Les fibres sont détubulées par choc osmotique suivant la technique de HOWELL et JENDEN (1967) : après isolement, la fibre toujours attachée dans la cuve à dissection est baignée pendant une heure dans une solution de Ringer additionnée de 400 mM/l de glycérol puis transportée et montée dans la cuve d'expérimentation. Dans le compartiment test, la solution de Ringer glycérolé qui a circulé pendant quelques minutes est rapidement remplacée par une solution de Ringer contenant 5 mM/l de $CaCl_2$ et 5 mM/l de $MgCl_2$, ceci permettant le maintien du potentiel de membrane au repos à sa valeur normale (EISENBERG, HOWELL et VAUGHAN, 1971). C'est donc seulement au niveau du compartiment central que la fibre sera détubulée.

Lors des expériences où la même fibre est étudiée, d'abord avec son système tubulaire transverse intact, puis détubulée, le lavage de la préparation par la solution de Ringer additionnée de glycérol se fait entièrement et uniquement au niveau du compartiment test.

6) Dispositif électronique.

Les variations de potentiel de la membrane en courant imposé (current-clamp) et les courants ioniques en potentiel imposé (voltage-clamp) ont été mesurés en utilisant l'appareillage électronique suivant :



- un amplificateur opérationnel (conçu et réalisé au laboratoire par Jean CHEVAL, Docteur-Ingénieur) ;

- un stimulateur constitué d'unités Tektronix 161 et 162 ;

- un oscilloscope Tektronix 502A ;

- un double générateur à courant continu.

Les enregistrements des variations de potentiel et de courant sont photographiés à l'aide d'une caméra Grass.

a) Circuit de mesure en courant imposé.

L'amplificateur fonctionne en contre-réaction totale externe. La sortie de l'amplificateur est reliée à l'une des entrées à travers la résistance de membrane R_m et la résistance longitudinale axoplasmique r_2 ; l'autre entrée est maintenue à la masse. Le point "A" qui correspond à la face interne de la membrane est ainsi constamment maintenu au potentiel de la masse.
Le stimulateur E est branché entre le compartiment test et la masse. La tension aux bornes de la résistance axoplasmique r_1 est constante. Le courant I qui va circuler dans le circuit de contre-réaction est égal à E/r_1 .

Ce courant (I. imposé) est donc constant ; il s'écoule à travers la résistance de membrane R_m ; on mesure ainsi les variations de potentiel aux bornes de R_m :

$$Us \text{ (tension de sortie)} = R_m \cdot I$$

avec $I = E / r_1$

Le schéma électrique équivalent est donné sur la figure 11A.

b) Circuit de mesure en potentiel imposé.

Le point "A" (face interne de la membrane) est, comme précédemment, maintenu au potentiel de la masse. L'amplificateur est maintenant bouclé sur lui-même à travers les résistances longitudinales axoplasmiques r_1 et r_2 (r_2 négligeable).
Par le stimulateur E, on impose un potentiel constant aux bornes de la résistance de membrane R_m. R_m est variable, le courant de membrane I_m est donc variable. On mesure les variations de I_m par les variations

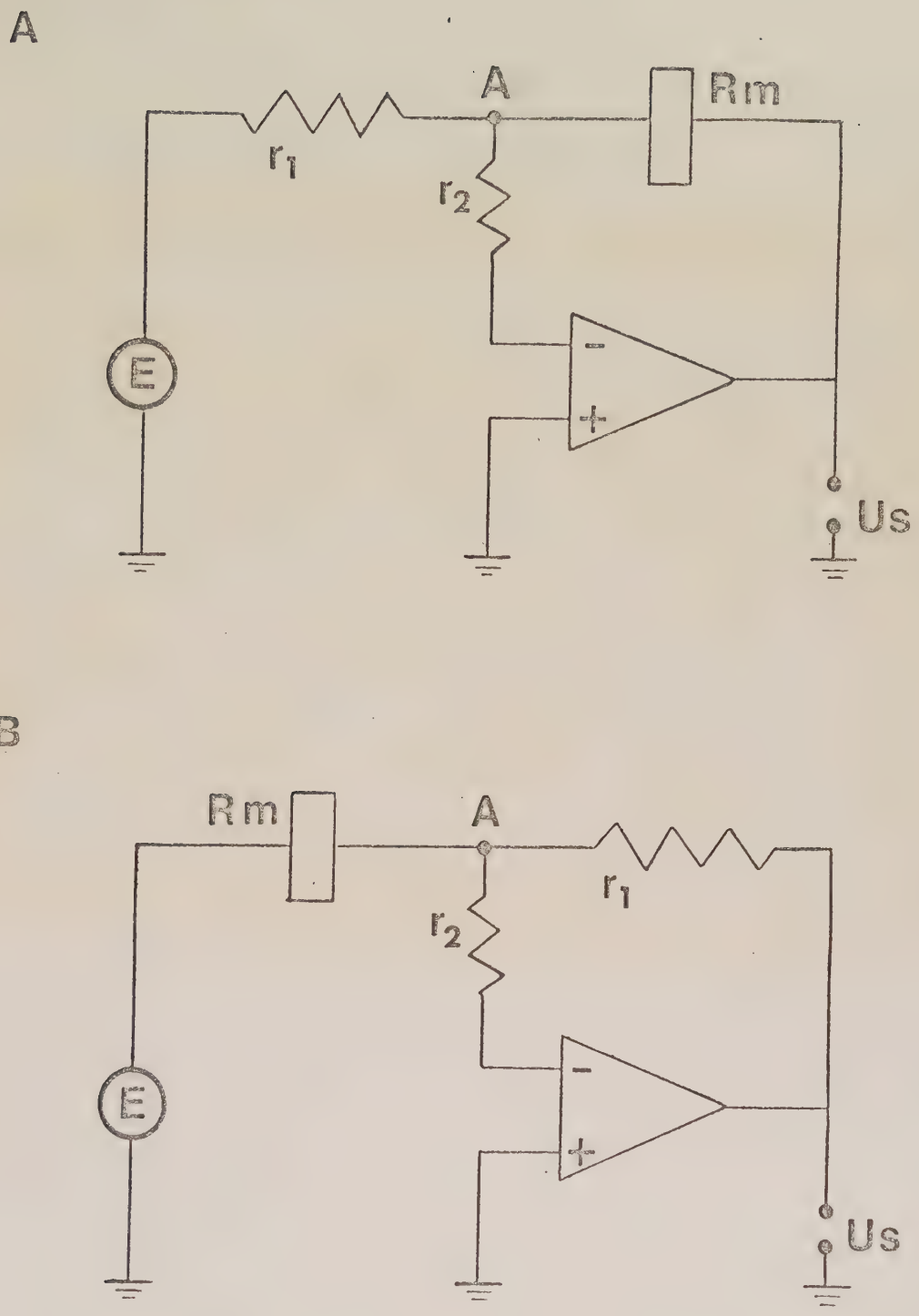


Figure 11 - Schémas électriques équivalents.

A - Circuit de mesure en courant imposé.

B - Circuit de mesure en potentiel imposé.

de potentiel provoquées aux bornes de r_1 par le courant du circuit de contre-réaction.

Le schéma électrique équivalent est donné sur la figure 11B.

7) Conditions générales d'expérimentation.

Les courants ioniques sont étudiés à l'aide de la méthode de voltage imposé décrite ci-dessus.

Le bon état de la préparation est toujours préalablement testé en courant imposé, le critère étant l'obtention d'un potentiel d'action d'amplitude comprise entre 120 et 140 mV. Le plus souvent, les fibres doivent être légèrement repolarisées par application d'un faible courant entrant.

L'amplitude du courant entrant tardif est toujours mesurée à partir de la ligne de base.

- RESULTATS -

PREMIERE PARTIE

I - CARACTERISTIQUES ET NATURE IONIQUE DU COURANT ENTRANT TARDIF.

Caractéristiques du courant tardif.

1) Décours - amplitude - durée.

2) Evolution en fonction du potentiel imposé.

3) Evolution comparée des courants initial et tardif.

4) Relation courant-potentiel.

Nature ionique du courant tardif.

1) Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en sodium.

2) Action de la tétrodotoxine.

3) Effet de solutions appauvries en calcium ou dépourvues de calcium.

4) Action du chlorure de manganèse.

II - LOCALISATION DU COURANT ENTRANT TARDIF.

1) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement des courants initial et tardif.

2) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium global.

3) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium de fibre détubulée.

DISCUSSION.

I - CARACTERISTIQUES ET NATURE IONIQUE DU COURANT ENTRANT TARDIF.

Sur des fibres normales, c'est à dire dont le système tubulaire transverse est intact, nous avons observé qu'après le courant initial sodique entrant se développe un deuxième courant entrant que nous avons appelé "courant entrant tardif".

Dans notre expérimentation sur les fibres du muscle semi-tendineux, ce phénomène a été constaté plus ou moins nettement sur environ un tiers des préparations étudiées.

Dans cette première partie, nous allons indiquer ses caractéristiques et déterminer sa nature ionique.

Sur les préparations où sont ainsi présents deux courants entrants distincts, nous avons vérifié que le courant initial présente les caractéristiques déjà décrites par d'autres auteurs (ILDEFONSE, 1970 ; ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN, 1970 ; ILDEFONSE et ROUGIER, 1972 ; MOORE, 1972) : ce courant est de nature sodique, il dépend du potentiel et du temps. Comme le montre la relation courant-potentiel (figure 12), il est entrant à partir d'une dépolarisation de + 35 mV, passe par un maximum pour V = + 55 mV et s'inverse à + 145 mV.

CARACTERISTIQUES DU COURANT ENTRANT TARDIF.

1) Décours - amplitude - durée.

Les enregistrements extraits de deux expériences (figures 13 et 14) montrent le décours des deux courants pour une dépolarisation imposée de +65 mV et +57 mV respectivement, de durée égale à 7 ms.

Le courant tardif, comme le courant initial, présente une phase d'activation, passe par un maximum puis s'inactive.

Son amplitude est inférieure à celle du courant initial. Calculée sur l'ensemble de nos expériences, la moyenne des rapports des amplitudes des deux courants pris à leur valeur maximum est de 4. Pour les deux expériences rapportées ici, ce rapport est respectivement de 2, 8 et 3, 7.

De plus, le courant tardif, pour un niveau de potentiel donné, atteint plus lentement sa valeur maximum que le courant initial.

2) Evolution en fonction du potentiel imposé.

Le courant tardif évolue comme le courant initial en fonction du potentiel imposé.

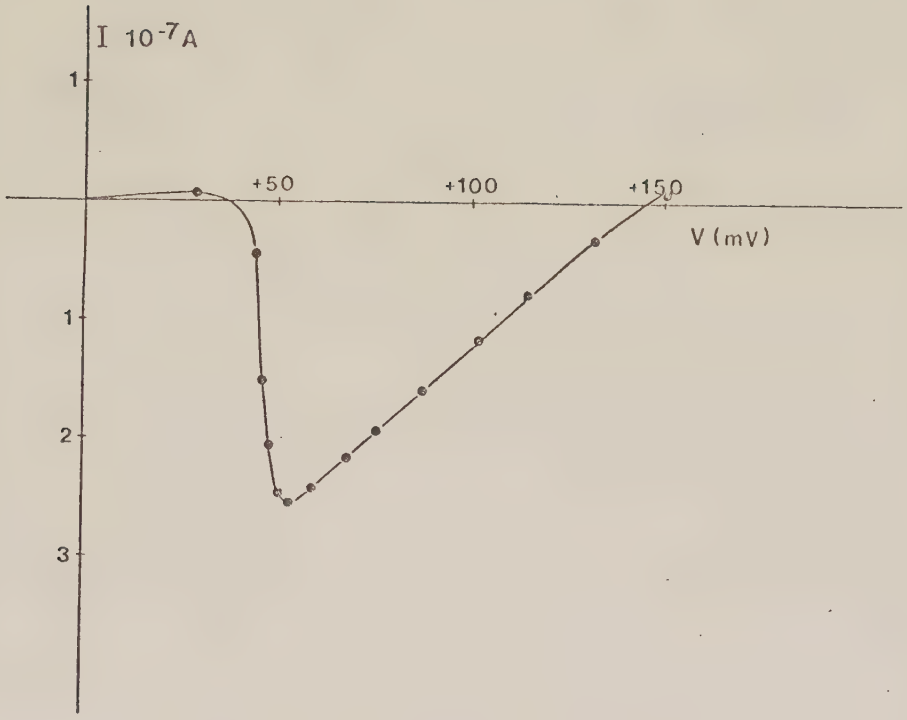


Figure 12 - Caractéristique courant-potentiel pour le courant initial entrant.

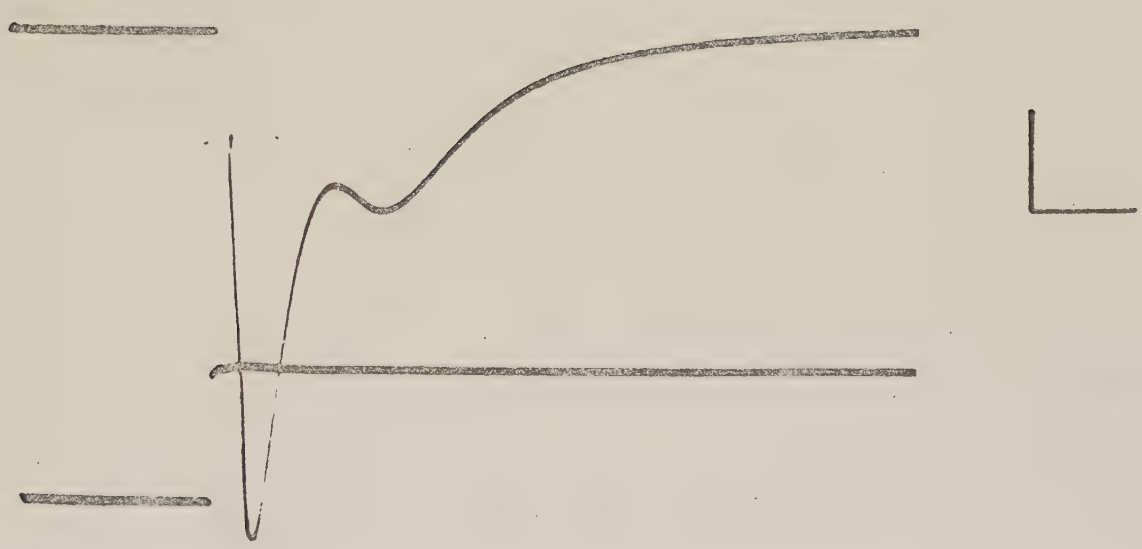


Figure 13 - Décours des courants entrants initial et tardif.

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

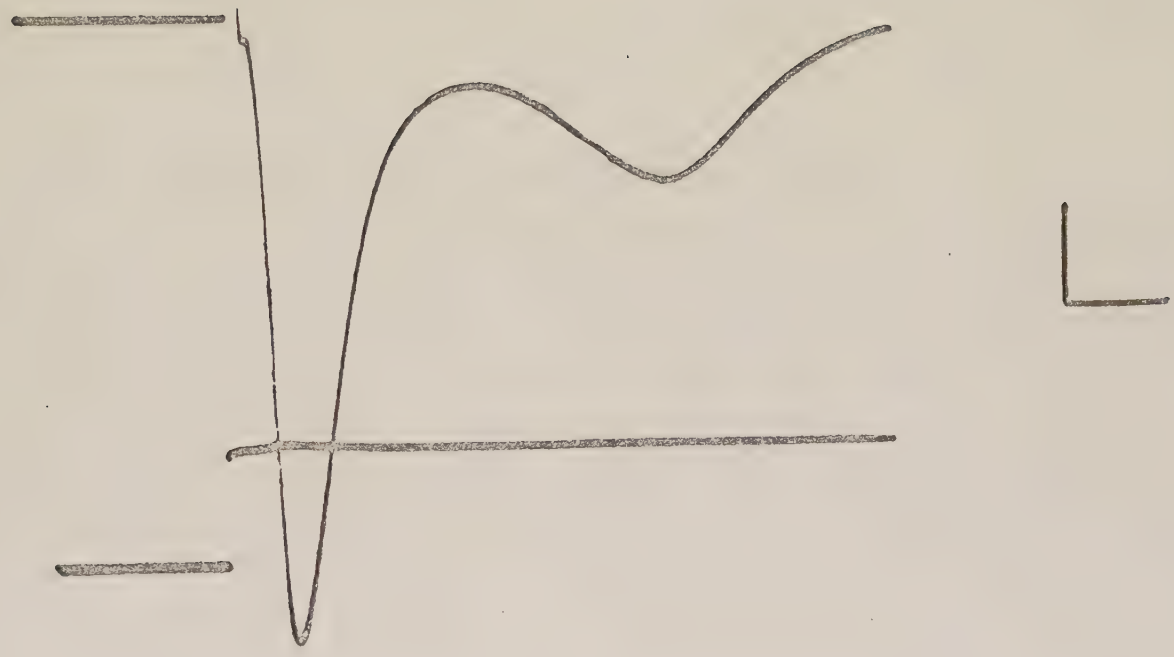


Figure 14 - Décours des courants entrants initial et tardif.

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

Les figures 15 et 16 représentant les courants pour différents potentiels imposés, montrent que, aussi bien pour le courant tardif que pour le courant initial, le pic de courant maximum est atteint d'autant plus vite que la dépolarisation est plus important. Par ailleurs, l'amplitude du courant tardif augmente avec l'amplitude de la dépolarisation jusqu'à atteindre une valeur maximum pour un potentiel qui est, pour les deux exemples donnés, respectivement de +61 mV et de +57 mV puis elle diminue. Les figures 15 et 16 illustrent, la première, l'augmentation, la seconde, la diminution du courant tardif et du courant initial suivant le niveau de potentiel.

Le délai séparant les deux pics de courant, initial et tardif, à leur amplitude maximum, est en moyenne de 2, 5 ms ; il est de 1, 2 ms et de 3, 2 ms pour les deux expériences citées.

3) Evolution comparée des courants initial et tardif.

Nous avons observé que, suivant les fibres, les deux courants apparaissent pour la même valeur de potentiel imposé ou pour des valeurs légèrement différentes : par exemple, le courant initial à +43 mV, le courant tardif à +50 mV. Cet écart, qui est ici de 7 mV, n'est jamais supérieur à 10 mV. Il n'est peut-être pas significatif si nous supposons que pour les faibles dépolarisations, le courant tardif est plus ou moins confondu avec la fin de la phase d'inactivation du courant initial et par conséquent difficilement mesurable à son début.

De même, nous avons noté que, selon les préparations, le niveau de potentiel correspondant au courant maximum est le même pour les deux courants (exemple : +57 mV - voir figure 16) ou quelque peu différent (exemple : +59 mV pour le courant initial, +63 mV, pour le courant tardif).

Enfin, pour des valeurs de potentiel comprises entre +75 mV et +90 mV, le courant tardif se confond progressivement avec le courant initial.

4) Relation courant-potentiel.

Les figures 17 et 18 représentent, pour deux fibres, les relations courant-potentiel établies pour les valeurs maximum du courant initial et du courant tardif à différents potentiels imposés. Les enregistrements de courants à partir desquels ces courbes ont été tracées, sont extraits des deux expériences desquelles nous avons tiré les illustrations précédentes (figures 13 à 16). Comme nous l'avons déjà indiqué, l'amplitude du courant tardif est mesurée à partir de la ligne de base (ligne de courant zéro). Les relations courant-potentiel sont établies suivant cette méthode de mesure. L'extrapolation de la phase d'inactivation du courant initial jusqu'à la ligne

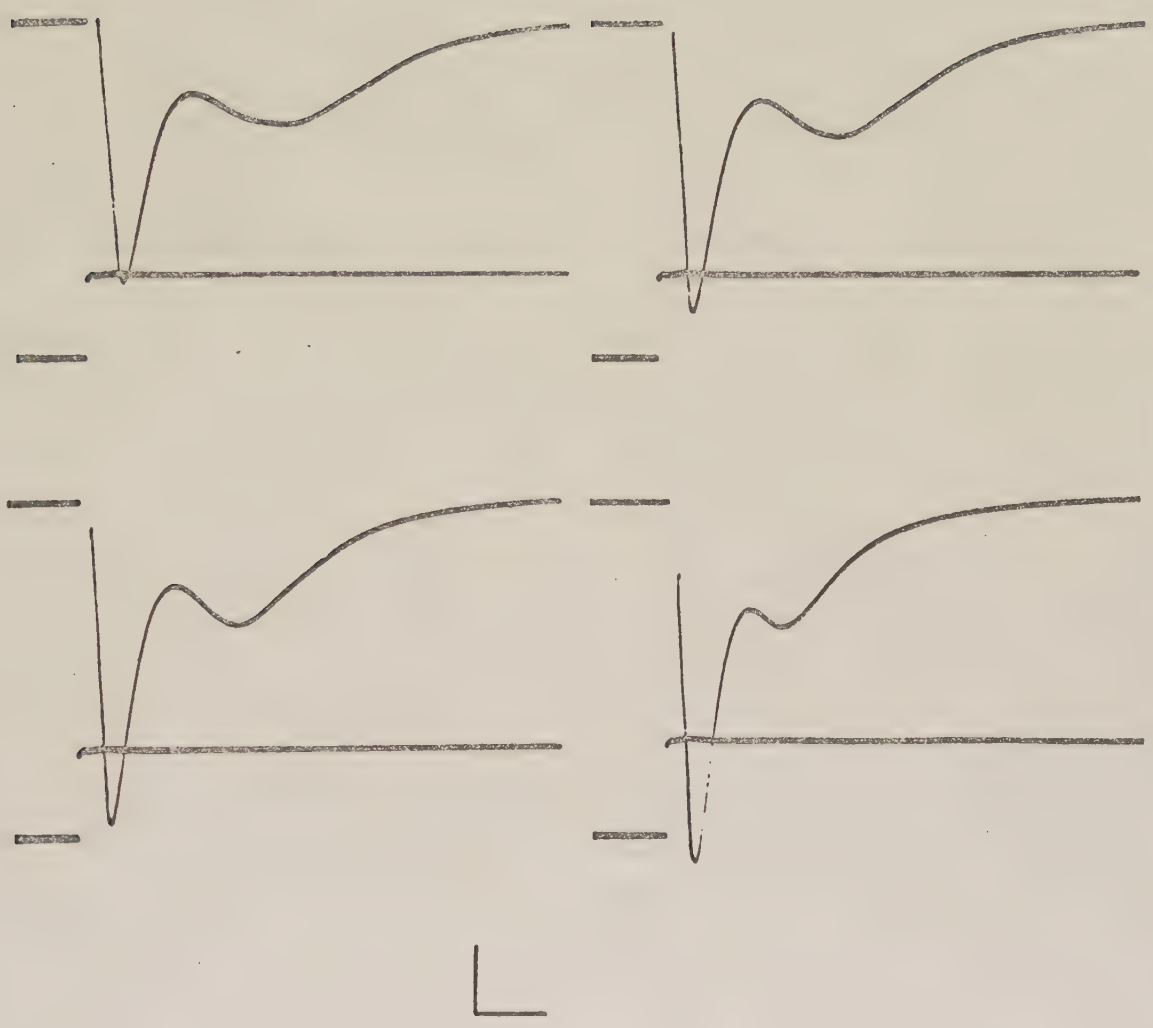


Figure 15 - Evolution des courants entrants initial et tardif en fonction du potentiel imposé.

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

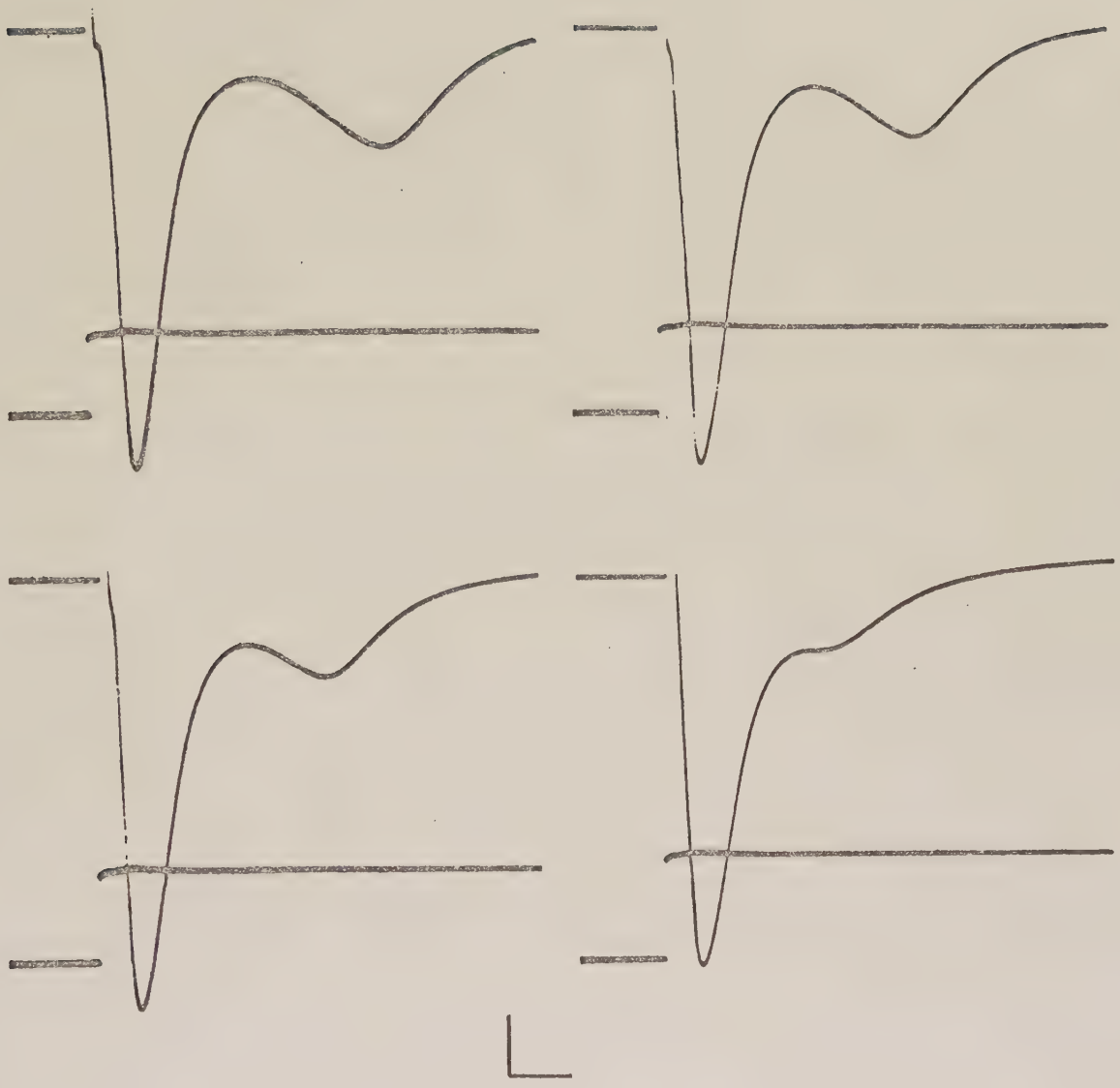


Figure 16 - Evolution des courants entrants initial et tardif en fonction du potentiel imposé.

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

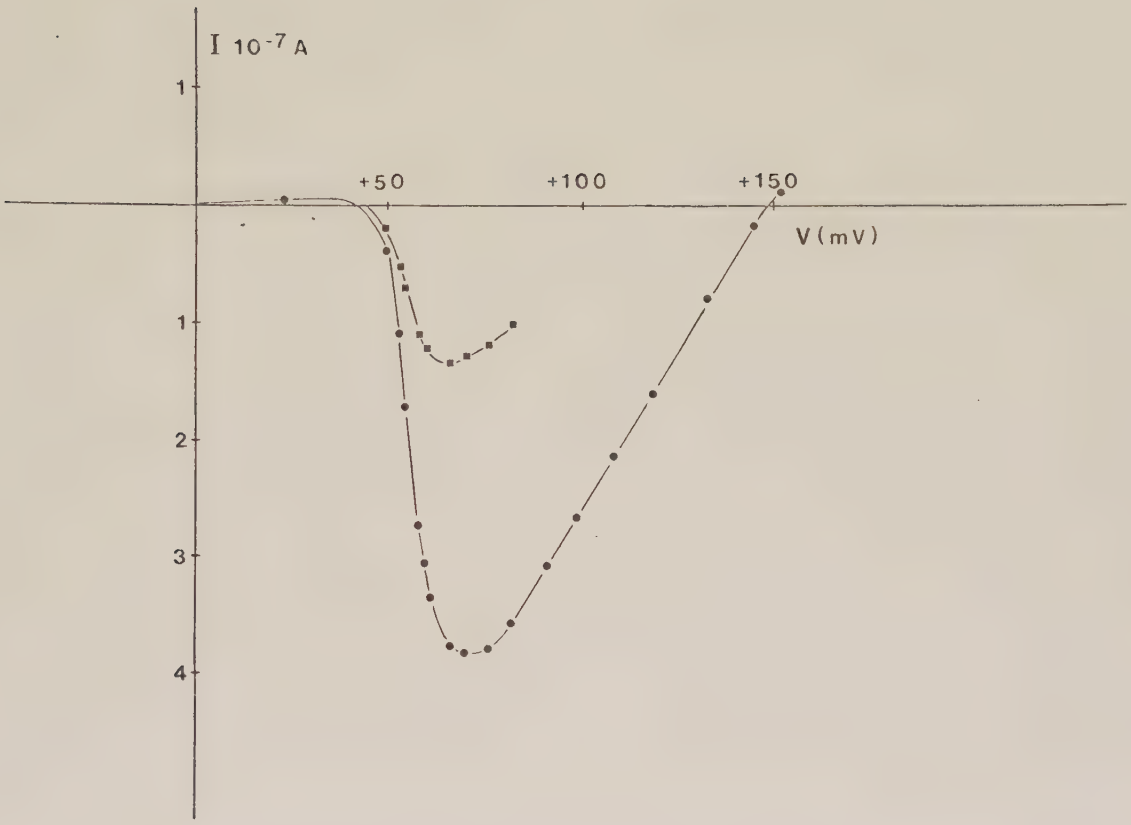


Figure 17 - Courbes courant-potentiel.

pour le courant entrant initial (●)

pour le courant entrant tardif (■)

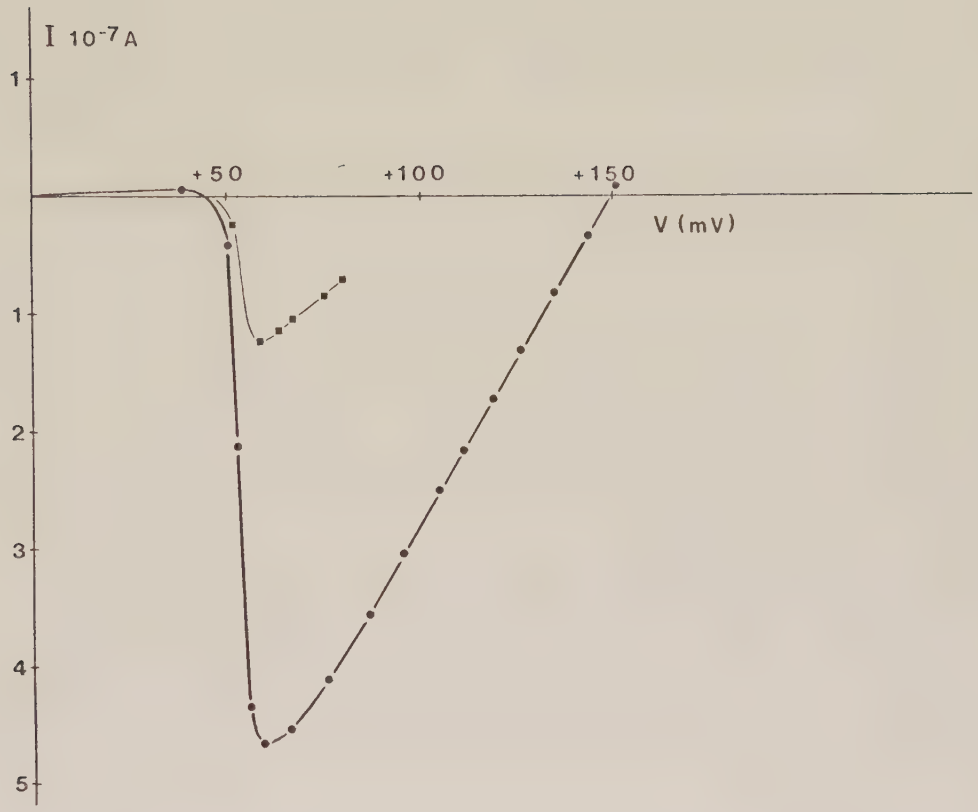


Figure 18 - Courbes courant-potentiel.

pour le courant entrant initial (●)

pour le courant entrant tardif (■)

de courant zéro fait apparaître que, dans la quasi-totalité des cas, le courant initial est nul au temps correspondant au pic du courant tardif. Nous pouvons donc considérer notre méthode de mesure comme étant valable.

Résumé.

Le courant tardif, comme le courant initial, dépend du potentiel et du temps. Pour des potentiels imposés compris entre +40 mV et +90 mV, il est parfaitement distinct du courant initial et la relation courant-potentiel que l'on peut établir pour ces valeurs est du même type que celle obtenue pour le courant initial.

A partir de ces similitudes, il paraissait logique de rechercher si ce courant tardif était au moins partiellement ou totalement de nature sodique et nous allons maintenant décrire les expériences que nous avons conduites dans ce but.

NATURE IONIQUE DU COURANT ENTRANT TARDIF.

1) Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en sodium.

Le chlorure de choline est le substituant du chlorure de sodium le plus fréquemment utilisé, particulièrement lorsqu'on ne veut pas modifier la concentration en chlore du milieu extérieur. Le saccharose ou le mannitol peuvent être aussi employés comme nous l'avons fait dans certaines de nos expériences.

ILDEFONSE (1970) a montré que l'amplitude du courant entrant initial diminue lorsque la concentration externe en sodium est abaissée.

Nous avons donc étudié l'effet de solutions appauvries en sodium sur le courant entrant tardif.

a) Solutions renfermant 30% de sodium.

Le chlorure de choline est utilisé pour remplacer le chlorure de sodium.

La figure 19 montre, pour un potentiel imposé de +54 mV :

en 1 - le courant initial et le courant tardif en milieu de Ringer normal.

en 2 - la diminution d'amplitude des deux courants sous l'effet de l'abaissement de la concentration en sodium.

en 3 - le courant initial très diminué ; le courant tardif dont l'amplitude en milieu normal est déjà faible par rapport à celle du courant initial n'est pas décelable sur ce tracé.

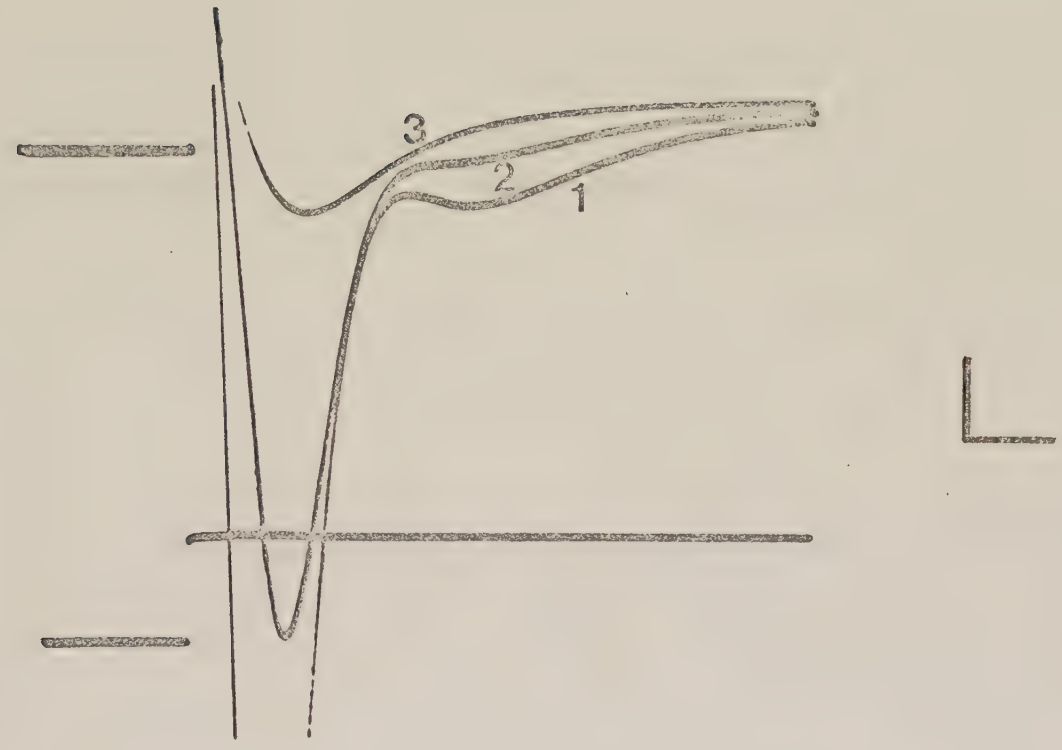


Figure 19 - Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en sodium sur les courants initial et tardif.

- Tracé 1 : enregistrement en Ringer normal.
- Tracé 2 et 3 : enregistrement en solution appauvrie en sodium (30%).

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

Les deux courants reviennent rapidement à leur amplitude initiale dès la circulation de Ringer normal rétablie.

b) Solutions renfermant 50% de sodium.

Le mannitol est ici utilisé pour remplacer le chlorure de sodium.

La figure 20 illustre les résultats obtenus : ces enregistrements sont pris à un potentiel imposé de +63 mV (tracé 1) et +57 mV (tracé 2).

En 1 - le courant initial et le courant tardif à leur amplitude maximum en solution de Ringer normal ; le délai entre les deux pics de courant est de 2, 1 ms.

En 2 - la diminution des deux courants en présence de 50% de chlorure de sodium ; le délai entre les deux courants est ici de 3, 7 ms, mais comme nous l'avons indiqué ci-dessus, le niveau de potentiel est légèrement plus faible.

On remarque que, en solution appauvrie en sodium, l'amplitude des deux courants est diminuée de la moitié par rapport à leur amplitude de référence et que leur phase d'activation est ralentie.

Sur la figure 21 sont présentées les courbes courant-potentiel établies en Ringer normal (A) et en solution appauvrie en sodium (B) pour le courant initial et le courant tardif.

L'amplitude du courant entrant tardif est ainsi, comme celle du courant initial, fonction de la concentration en sodium du milieu extracellulaire. C'est là un premier argument en faveur de la participation des ions sodium au courant tardif.

2) Action de la tétrodotoxine.

La tétrodotoxine (TTX) est un poison extrait des glandes génitales d'un poisson de l'Océan Pacifique, le Tetrodon. Cette substance bloque sélectivement la perméabilité de la membrane au sodium.

L'important article de KAO (1966) présente les travaux réalisés pour étudier ses effets sur différents tissus.

Sur la fibre musculaire squelettique, NARAHASHI, DEGUCHI, URAKAWA et OHKUBO (1960) montrent son action inhibitrice sur la perméabilité sodique. Ultérieurement, ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1968) , ROUGIER, VASSORT et ILDEFONSE (1968) observent que le courant entrant initial est supprimé par cette substance.

Il était donc intéressant d'en étudier l'action sur le courant en-

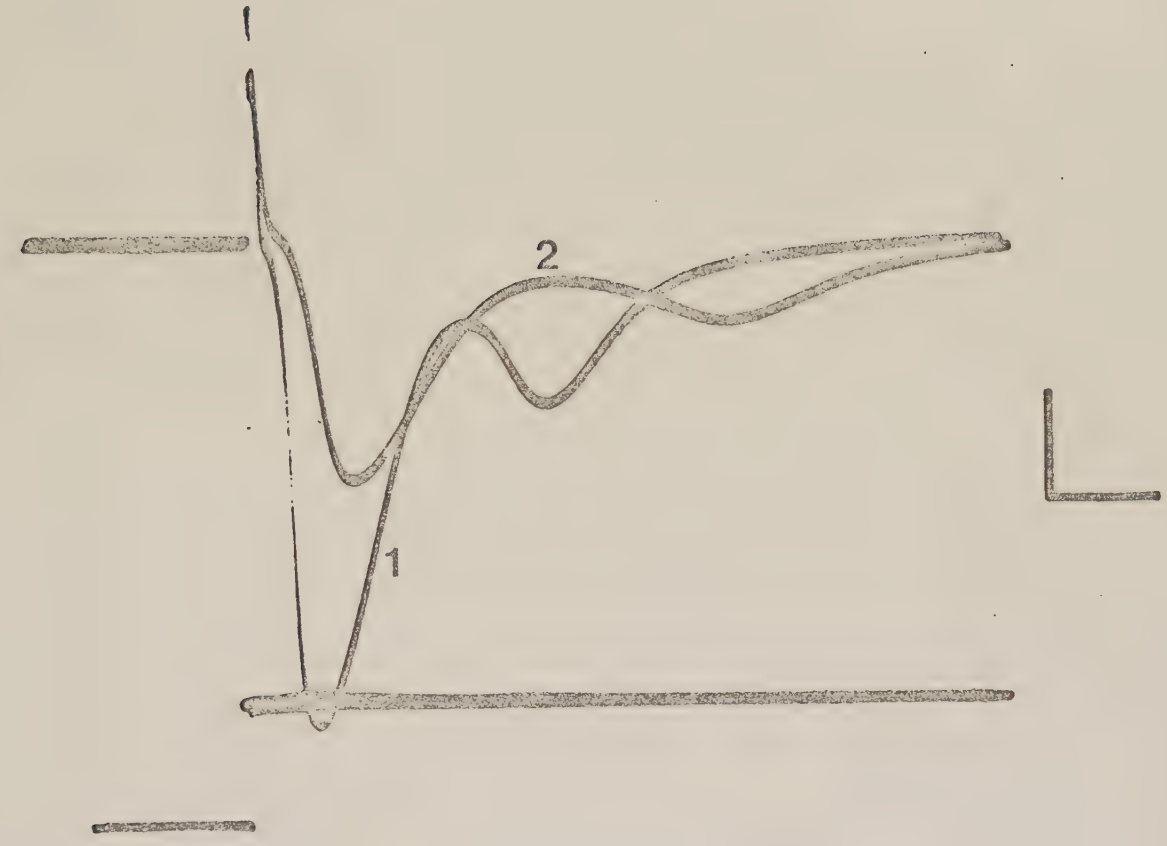


Figure 20 - Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en sodium sur les courants entrants initial et tardif.

- Tracé 1 : enregistrement en Ringer normal.
- Tracé 2 : enregistrement en solution appauvrie en sodium (50%).

Echelle horizontale : 1 ms.
Echelle verticale : 50 mV.

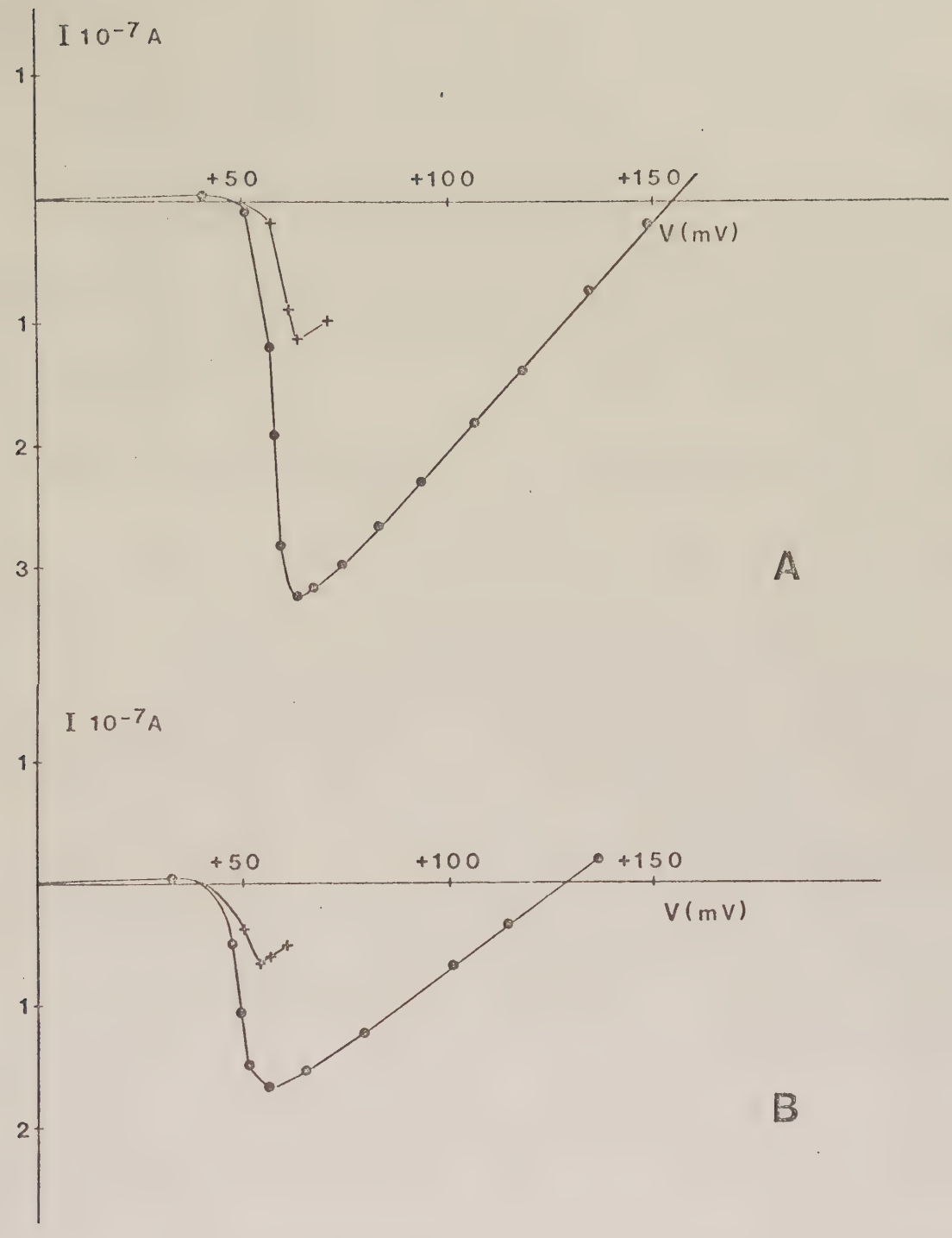


Figure 21 - Relations courant-potentiel établies en Ringer normal (A) et en solution appauvrie en sodium (B) pour le courant initial et le courant tardif.

trant tardif.

La figure 22 montre l'évolution, en présence de tétrodotoxine à la concentration de 10^{-8} g/l , du courant initial et du courant tardif qui diminuent rapidement et disparaissent.

Le tracé 1 est l'enregistrement de contrôle pris en solution de Ringer normal ; les deux courants sont à leur amplitude maximum. La réversibilité de cet effet est quasi-totale.

Donc, comme le courant initial, le courant tardif est inhibé par la tétrodotoxine.

3) Effets de solutions appauvries en calcium ou dépourvues de calcium.

L'effet de la diminution de la concentration calcique extracellulaire sur le courant entrant sodique a été étudié par FRANKENHAEUSER et HODGKIN (1957) sur l'axone de Calmar, WEIDMAN (1955) sur les cellules de Purkinje et ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUIL et CORABOEUF (1969) sur les fibres atriales de Grenouille :ces auteurs observent un abaissement du seuil d'activation du courant sodium et un déplacement de la relation courant-potentiel de 10 à 15 mV vers les faibles dépolarisations.

Nous avons recherché l'effet d'un abaissement de la concentration externe en calcium sur le courant initial et sur le courant tardif. Quelques expériences ont été réalisées en milieu sans calcium.

a) Solutions appauvries en calcium.

Les solutions contiennent 0, 18 mM/l de chlorure de calcium, soit 1/10 de la concentration normale.

Sur la figure 23 ont été représentées les courbes courant-potentiel pour le courant initial en Ringer normal et en milieu appauvri en calcium.

On remarque que l'abaissement de la teneur en calcium déplace la courbe de 10 mV vers la gauche pour des dépolarisations modérées, ce qui correspond à une diminution du seuil d'activation du courant. L'amplitude du pic sodium maximum est très légèrement augmentée.

Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus sur d'autres cellules.

Des modifications semblables sont observées pour le courant tardif.

La figure 24 montre, pour un potentiel imposé de +59 mV :

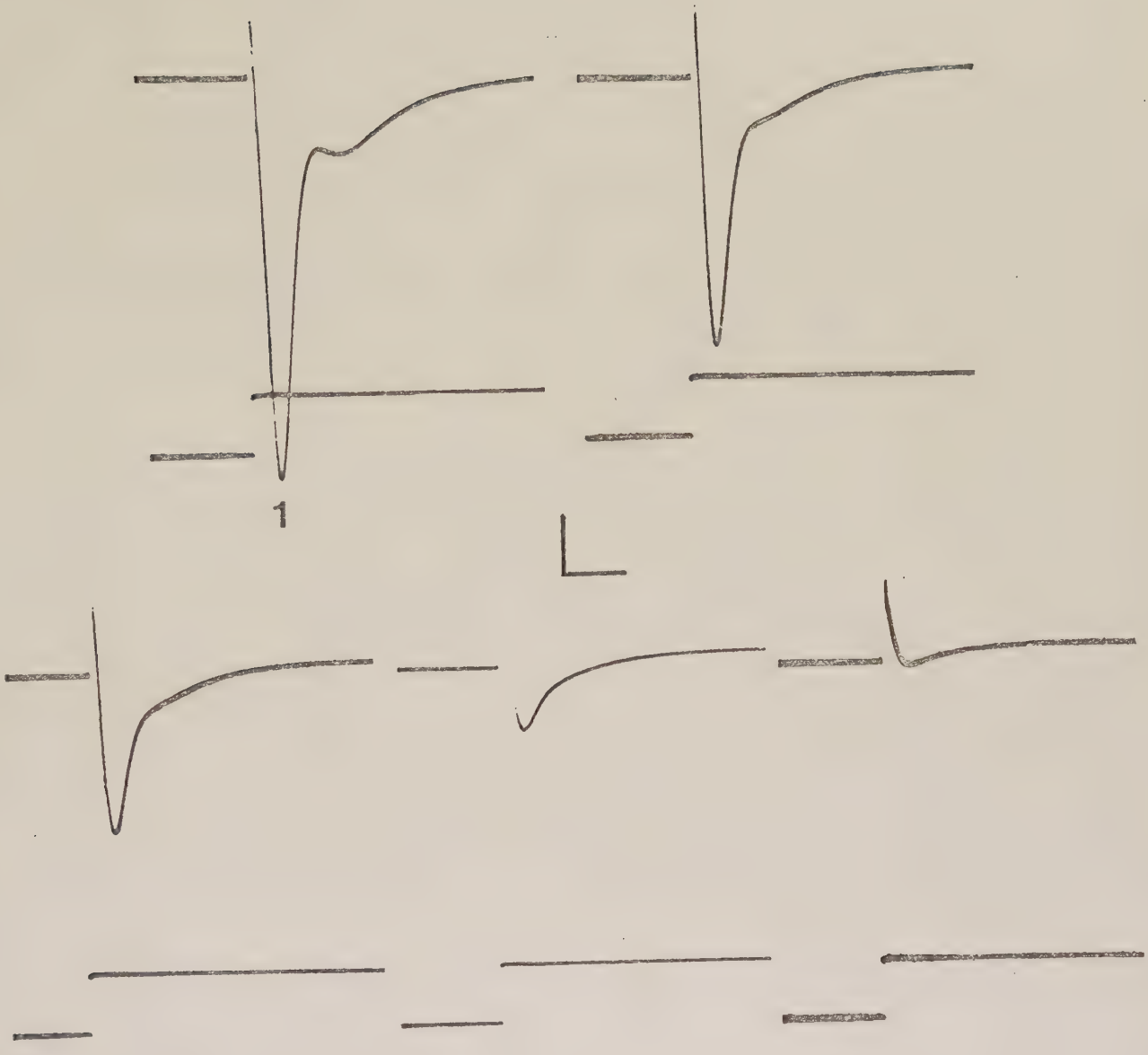


Figure 22 - Action de la Tétrodotoxine (TTX) sur les courants entrants initial et tardif.
Le tracé 1 est l'enregistrement de référence en Ringer normal.

Echelle horizontale : 2 ms.
Echelle verticale : 50 mV.

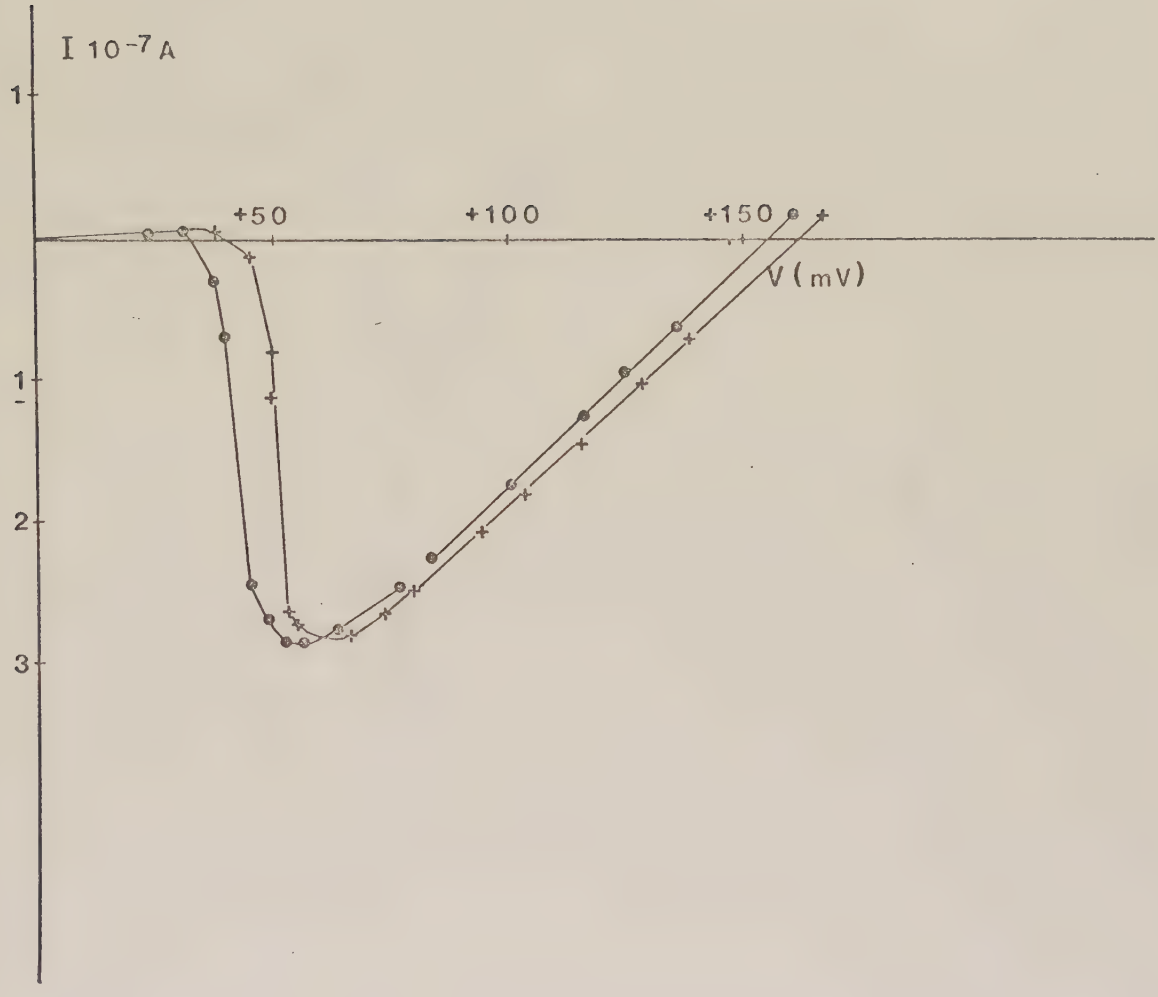


Figure 23 - Relations courant-potentiels établies pour le courant initial :

(+) en Ringer normal.

(⊙) en Ringer appauvri en calcium (0, 18 mM/l).

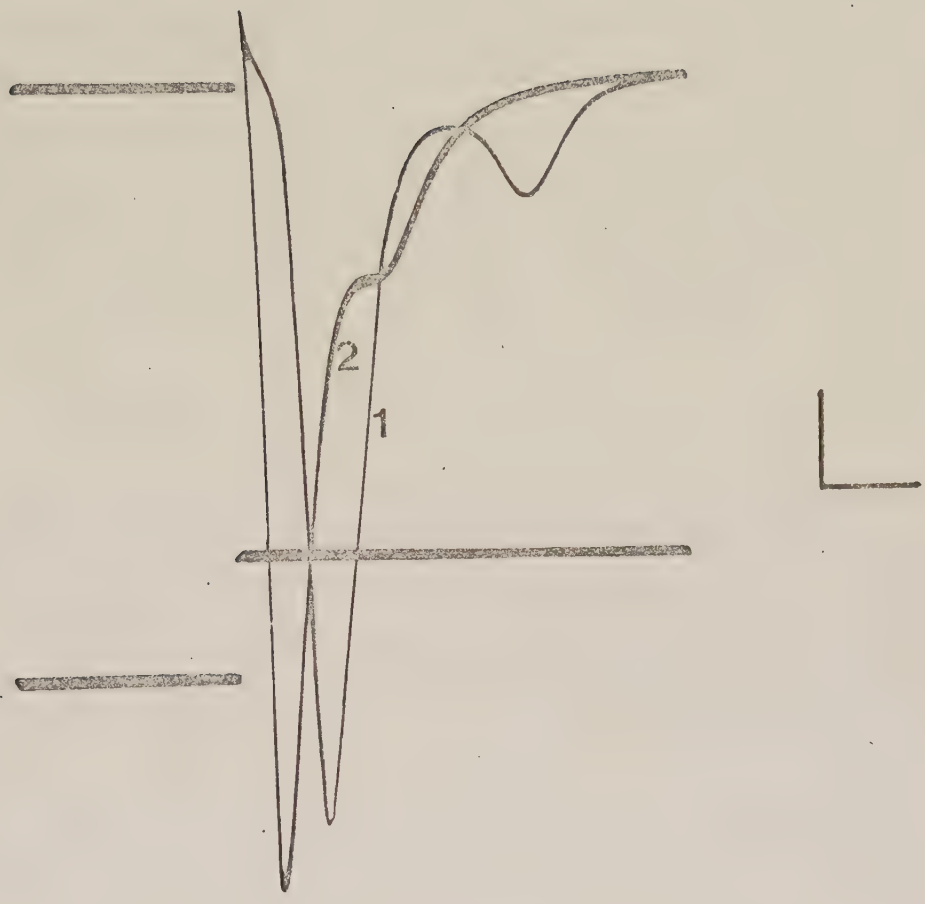


Figure 24 - Effet de la diminution de la concentration extracellulaire en calcium sur les courants entrants initial et tardif.

- Tracé 1 : enregistrement en Ringer normal.
- Tracé 2 : enregistrement en solution appauvrie en calcium (0, 18 mM/l).

Echelle horizontale : 2 ms.
Echelle verticale : 50 mV.

en 1 : les deux courants en Ringer normal.

en 2 : leur décours en Ringer 1/10 calcium ; on note que le courant tardif, comme le courant initial, est plus rapidement activé ; son amplitude, mesurée à partir de la ligne de courant zéro, apparaît sensiblement augmentée mais on constate, à partir de l'extrapolation de la phase d'inactivation du courant initial, que ce dernier n'est pas nul au temps correspondant au sommet du courant tardif : l'augmentation réelle du courant tardif est donc, en fait, plus faible et du même ordre de grandeur que celle du courant initial (environ 10%). L'activation plus rapide du courant tardif diminue le délai qui le sépare du courant initial et modifie son décours apparent car il tend à se confondre avec la phase d'inactivation du précédent.

b) Solutions sans calcium.

On observe comme précédemment un déplacement de la relation courant-potentiel vers les faibles dépolarisations, d'environ -15 mV, aussi bien pour le courant initial que pour le courant tardif.

Les deux courants sont activés plus rapidement ; par suite de son activation plus rapide, le courant tardif est en partie confondu avec le courant initial, mais on peut noter que les phases d'inactivation sont superposables.

La figure 25 montre le décours des deux courants pour différents potentiels imposés en Ringer normal et en solution sans calcium.

Les effets de l'appauvrissement en calcium extracellulaire et de la suppression de cet ion sont donc identiques sur les deux courants entrants.

4) Action du chlorure de manganèse.

Le manganèse est un inhibiteur de la perméabilité calcique.

Après les travaux de FATT et GINSBORG (1958) sur le muscle d'écrevisse, HAGIWARA et NAKA (1964), HAGIWARA et NAKAJIMA (1966) montrent que l'ion Mn^{++} supprime le potentiel d'action d'origine calcique des fibres musculaires de Balane.

Sur la fibre musculaire atriale de Grenouille (ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUÏL et CORABOEUF, 1969), l'ion Mn^{++} diminue la durée et l'amplitude du potentiel d'action, affectant la seconde partie de la phase ascendante sans en changer la première ; la relation courant-potentiel pour le courant initial sodique, établie en présence de manganèse, ne diffère pas de celle obtenue en Ringer normal. Sur la fibre atriale égale-

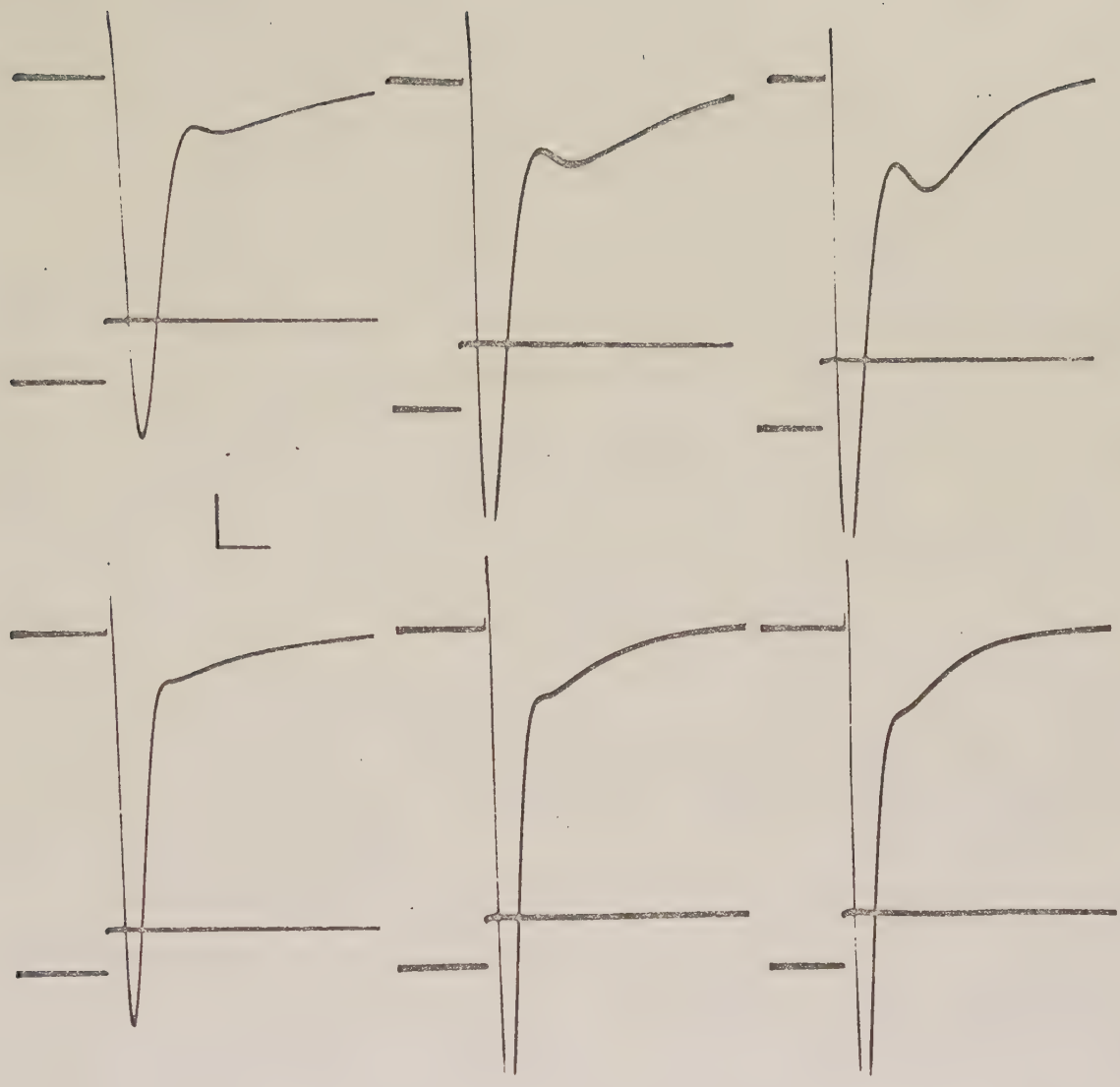


Figure 25 - Effet de la suppression du calcium sur les deux courants initial et tardif, pour différents potentiels imposés.

- Tracés supérieurs : en Ringer normal.
- Tracés inférieurs : en Ringer sans calcium.

Echelle horizontale : 2 ms.
Echelle verticale : 50 mV.

ment, TARR (1971) observe que le manganèse (1 à 3 mM/l) supprime le courant entrant lent et diminue très légèrement le courant entrant rapide ; la relation courant-potentiel pour le courant rapide sodique est déplacée vers la droite d'environ 10 mV.

Sur la fibre musculaire de crabe (MOUNIER et VASSORT, 1974) l'ion Mn^{++} supprime le courant entrant calcique.

Sur la fibre musculaire squelettique de Grenouille (OOTA, TAKAUJI et NAGAI, (1972) observent principalement une forte augmentation d'amplitude du potentiel consécutif en présence de 10 mM de $MnCl_2$, le potentiel de repos et le potentiel d'action étant inchangés; CHIARENDINI et STEFANI (1973) notent une hyperpolarisation de la membrane sous l'action de 10 à 20 mM de $MnCl_2$ ainsi qu'un allongement du potentiel consécutif et une augmentation du seuil électrique.

Nous avons étudié l'effet du chlorure de manganèse (2 et 4 mM/l) à la fois sur le courant initial et sur le courant tardif.

a) Courant initial.

Sur la figure 26 sont représentées les courbes courant-potentiel obtenues en Ringer normal et en présence de $MnCl_2$ (2 mM/l) pour les valeurs maximum du courant initial.

En Ringer normal, le courant est entrant à partir de +45 mV, passe par un maximum à +68 mV et s'inverse à +153 mV.

En présence de chlorure de manganèse, il est entrant à partir de +57 mV et passe par un maximum à +79 mV ; le potentiel d'inversion n'est pas changé.

Le manganèse déplace ainsi la relation courant-potentiel d'un peu plus de 10 mV vers la droite, par suite de l'augmentation du seuil d'activation du sodium. L'amplitude maximum du pic sodium est, par contre, à peine diminuée.

L'analogie observée sur d'autres structures entre l'action du manganèse et celle d'une augmentation de la concentration extracellulaire en calcium, notamment le déplacement des courbes courant-potentiel vers la droite, se retrouve ainsi sur cette structure.

b) Courant tardif.

Le courant entrant tardif n'est pas supprimé par le manganèse. Pour les dépolarisations élevées, rapidement activé, il se confond avec le courant initial, comme cela est régulièrement observé en milieu normal. Néanmoins, bien que toujours dépendant du potentiel et du temps, il présente

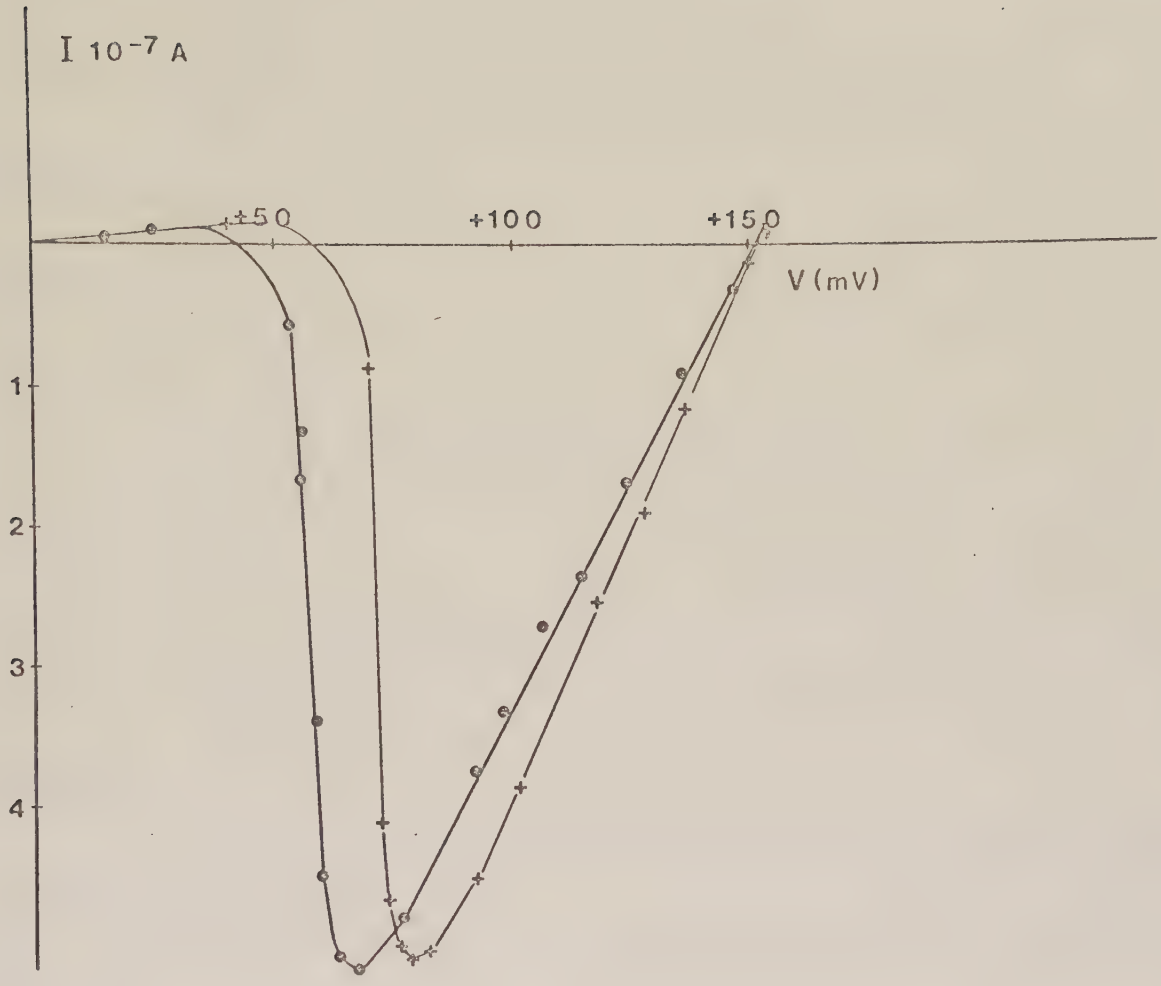


Figure 26 - Relations courant-potentiel établies pour le courant initial :

(⊙) en Ringer normal.

(+) en présence de $MnCl_2$

une amplitude maximum mesurable à +75 mV en présence de $MnCl_2$ - +62 mV en Ringer normal - pour l'expérience choisie, soit un déplacement de 13 mV vers les fortes dépolarisations. Pour le courant initial à son amplitude maximum, le décalage est de 12 mV.

La figure 27 montre le décours des deux courants en présence de $MnCl_2$ pour deux niveaux de potentiel imposé : +72 et +75 mV.

Ces résultats permettent d'éliminer une possible participation des ions calcium à ce courant.

Résumé.

Un deuxième courant entrant se développe après le courant initial entrant sodique.

Ce courant dépend du potentiel et du temps ; son amplitude est fonction de la concentration extracellulaire en sodium.

Il est supprimé par la tétrodotoxine, inhibiteur de la perméabilité sodique.

Il persiste quand on diminue la concentration externe en calcium ou quand on supprime le calcium.

Il n'est pas aboli par le chlorure de manganèse.

Conclusion.

Ce courant est donc très vraisemblablement de nature sodique comme le courant initial.

Une participation des ions calcium ne semble pas devoir être envisagée.

II - LOCALISATION DU COURANT ENTRANT TARDIF

Nous avons ainsi, sur le même type de préparation et dans des conditions d'expérimentation et d'enregistrement rigoureusement identiques, enregistré soit un seul courant entrant sodique soit deux courants entrants également dépendants du potentiel et du temps et fonction de la concentration extracellulaire en sodium.

Le courant entrant tardif qui se développe sur des fibres normales, n'est, par contre, jamais observé sur des préparations dont le système tubulaire transverse est sélectivement détruit par choc osmotique.

Or, nous avons rapporté précédemment (voir Historique) que les travaux de divers auteurs suggèrent l'hypothèse d'une membrane tubulaire excitable comme la membrane plasmique de surface dont elle est le prolonge-

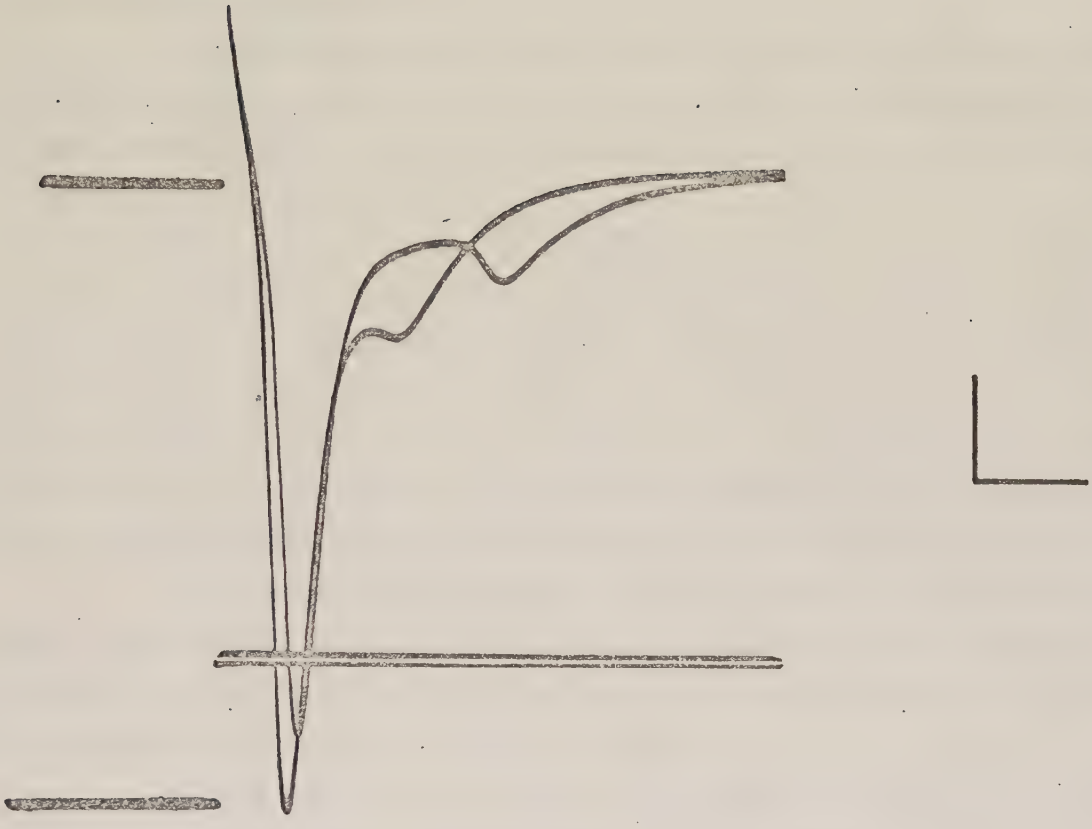


Figure 27 - Décours des courants initial et tardif en présence de $MnCl_2$ pour deux niveaux de potentiel imposé : +72 et +75 mV.

Echelle horizontale : 2 ms.
Echelle verticale : 50 mV.

ment.

Les caractéristiques et la nature ionique du courant entrant tardif, en tous points semblables à celle du courant initial ainsi que l'existence d'un système membranaire supposé de type "excitable" nous ont donc conduite à formuler l'hypothèse suivant laquelle ce deuxième courant entrant serait d'origine tubulaire.

Ce courant tubulaire est ainsi soit distinct du courant initial qui ne concerne alors que la membrane de surface d'où l'appelation de courant "tardif" soit confondu avec lui en un seul courant global à double composante, externe et tubulaire.

Il est possible que le délai qui, sur certaines préparations, sépare le courant de la membrane externe et le courant supposé d'origine tubulaire soit lié au diamètre des fibres considérées. Sur les fibres de petit diamètre de Rainette (Hyla arborea) ou de Rana dalmatina, ce courant n'est pas individualisé. Par contre, lorsque nous avons expérimenté sur des fibres sélectionnées en fonction de leur diamètre (environ 120 μm), nous avons vu plus nettement et plus régulièrement apparaître le deuxième courant entrant.

Les tubules transverses étant ouverts sur le milieu extracellulaire, la concentration en sodium dans la lumière tubulaire est donc, dans les conditions normales, à tout moment la même que celle de la solution physiologique au contact de la membrane externe.

Si la membrane tubulaire est le siège d'une augmentation régénérative de la conductance sodique se traduisant par le deuxième courant entrant, une concentration minimum en sodium à l'intérieur du tubule est nécessaire pour que la membrane soit excitable. Aussi longtemps que cette concentration n'est pas atteinte, aucun courant ne pourra se développer. Mais, quelles que soient quantitativement les modifications de la concentration en sodium de la solution, les membranes de surface et tubulaire en seront affectées dans le même temps car la diffusion s'effectuera très rapidement dans les tubules.

Il était, par conséquent, intéressant de créer artificiellement des conditions dans lesquelles la diffusion de solutions dans les tubules était retardée.

Les expériences que nous allons décrire sont inspirées d'un travail de CAPUTO et DIPOLO (1973). Ces auteurs ont montré l'influence de solutions de viscosité élevée par addition de dextrane sur le temps de rétablissement d'une contraction normale abolie par une suppression momentanée du sodium extracellulaire (voir Historique, paragraphe 3). Dans ces condi-

tions expérimentales, les tubules sont d'abord vidés de leur contenu sodique ; la présence de dextrane retarde la diffusion des ions sodium dans la lumière tubulaire lors du retour en solution de Ringer normal.

Nous avons étudié l'effet de solutions de Ringer de haute viscosité par addition de dextrane sur le temps de rétablissement d'un courant sodium, d'une part, des courants initial et tardif d'autre part.

Le protocole expérimental était le suivant : le courant sodium est mesuré à son amplitude maximum en Ringer normal ; la portion de fibre dans le compartiment test est ensuite lavée en solution de Ringer dépourvue de chlorure de sodium remplacée par du chlorure de choline. On observe alors une disparition rapide du courant entrant sodique. Le temps de rétablissement du courant entrant à sa valeur de référence est alors mesuré :

a) après retour en solution de Ringer normal.

b) après retour en solution de Ringer normal additionnée de dextrane à 15%.

Dans le premier cas, le courant revient à son amplitude initiale en 15 à 30 secondes ; dans le deuxième cas, des temps de l'ordre de 60 à 90 secondes sont nécessaires.

Cette différence ne peut s'expliquer qu'en supposant qu'une partie du courant se développe au niveau de la membrane tubulaire : lors du retour en solution de Ringer normal, la diffusion des ions sodium dans la lumière tubulaire est suffisamment rapide pour que la membrane externe et la membrane tubulaire puissent de façon quasi- contemporaine reprendre leur état d'excitabilité normale ; par contre, en solution de haute viscosité, la pénétration des ions sodium dans les tubules étant retardée, la membrane tubulaire est donc plus longtemps inexcitable que la membrane externe.

Afin de déterminer le décours temporel du rétablissement du courant global ou des deux courants initial et tardif à leur valeur de référence en solution de Ringer normal sans dextrane puis additionnée de dextrane, des enregistrements photographiques sont réalisés à une fréquence déterminée, ce qui permet de mesurer très précisément l'augmentation d'amplitude en fonction du temps et dans le cas de deux courants sodium distincts de mettre en évidence que le deuxième courant attribué aux tubules réapparaît après le courant initial.

1) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement des courants initial et tardif.

Les courants initial et tardif sont enregistrés en Ringer normal à leur amplitude maximum qui sera la valeur de référence.

Les courants sont momentanément abolis par la suppression du sodium extracellulaire.

Lors du retour en Ringer normal, les deux courants sont rétablis en environ 15 secondes à leur amplitude de référence.

Si, par contre, le retour en milieu sodique normal se fait en présence de dextrane, on observe, comme le montre la figure 28, que le courant initial réapparaît le premier au bout de 10 secondes (tracé 1) avec une amplitude égale à 64% de l'amplitude de référence alors que le courant tardif, à peine décelable après environ 40 secondes, n'apparaît très nettement qu'au bout de 50 secondes seulement avec une amplitude égale à 65% de l'amplitude initiale (tracés 2 et 3).

2) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium global.

Le courant sodium global est enregistré en Ringer normal à son amplitude maximum.

Le courant est alors aboli par suppression du chlorure de sodium extracellulaire remplacé par du chlorure de choline.

a) Le rétablissement du courant à son amplitude de référence est filmé à une fréquence choisie (0, 3 Hz) dès le retour de la solution de Ringer normal.

Les courbes "a" de la figure 29 et "b" de la figure 30 représentent les augmentations d'amplitude du courant en fonction du temps pour deux fibres.

Le temps "zéro" correspond au moment précis où le robinet permettant les changements de solution est manoeuvré.

Le courant est rétabli à son amplitude de référence en 16 secondes (courbe "a", figure 29) et 25, 8 secondes (courbe "b", figure 30).

b) Le rétablissement du courant est filmé à la même fréquence en présence de dextrane additionné à la solution de Ringer normal.

Le temps "zéro" est pris comme précédemment.

Les courbes "a' "de la figure 29 et "b' "de la figure 30 représentent les augmentations d'amplitude du courant en fonction du temps pour les deux mêmes fibres.

Le courant revient à son amplitude de référence en 29 secondes

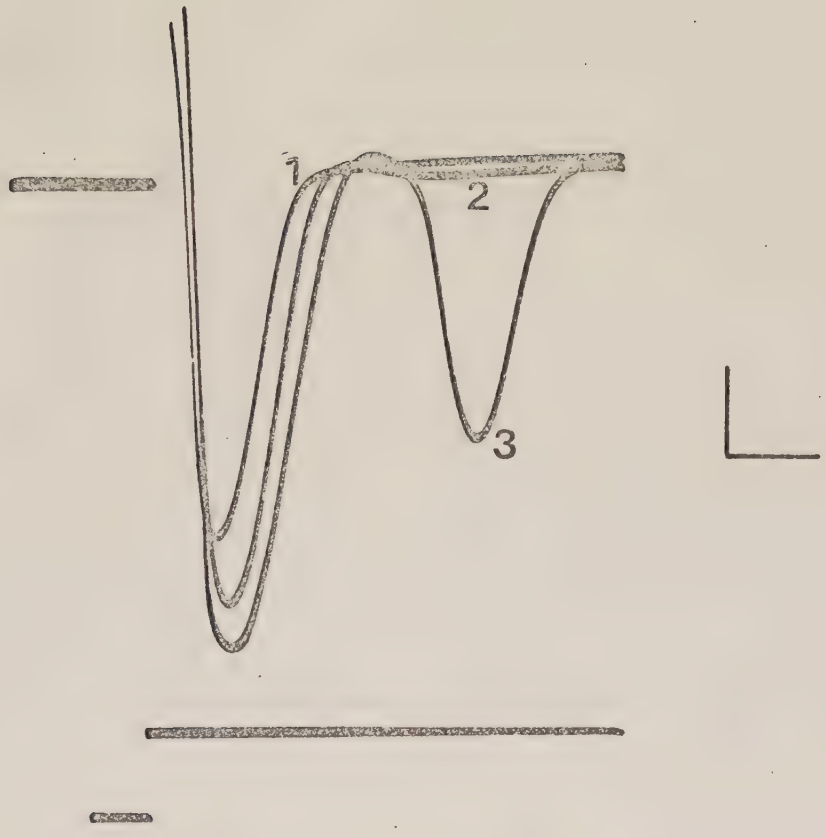


Figure 28 - Rétablissement des courants entrants initial et tardif en solution de Ringer de haute viscosité par addition de dextrane.

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

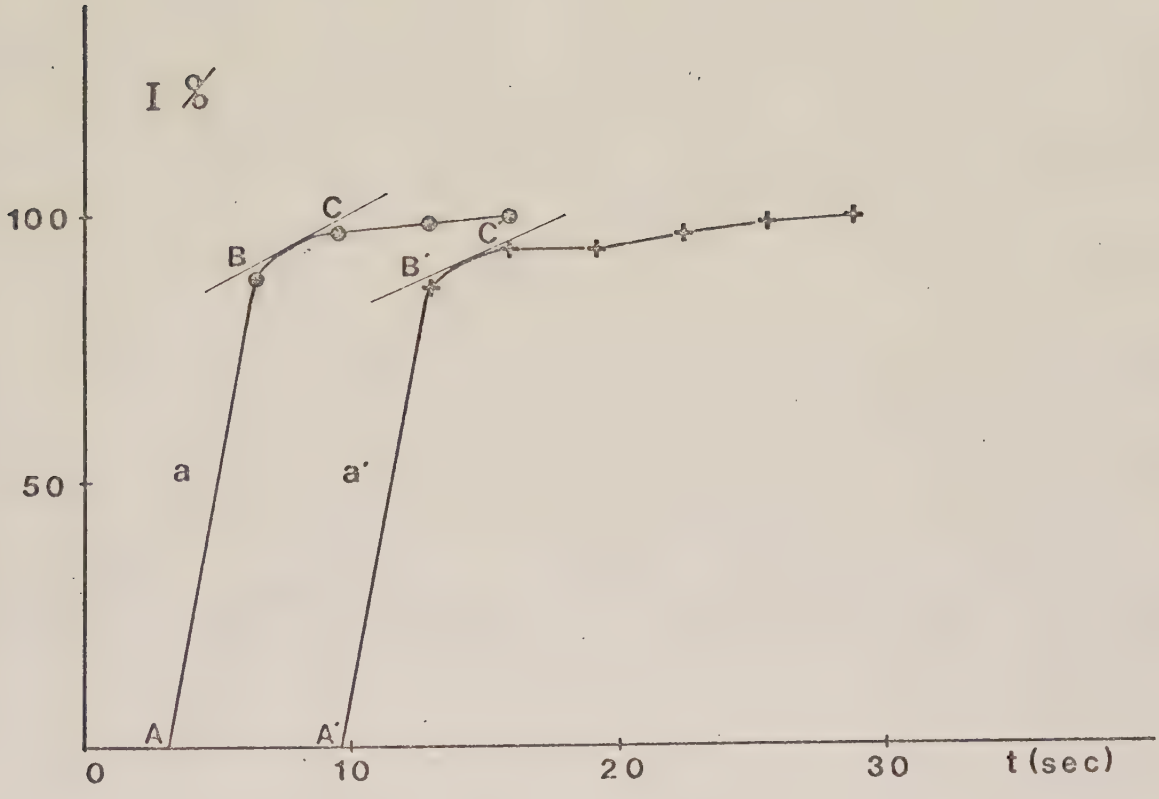


Figure 29 - Représentation des augmentations d'amplitude du courant sodium global en fonction du temps :

Courbe "a" : en Ringer normal.

Courbe "a'" : en Ringer normal additionné de dextrane.

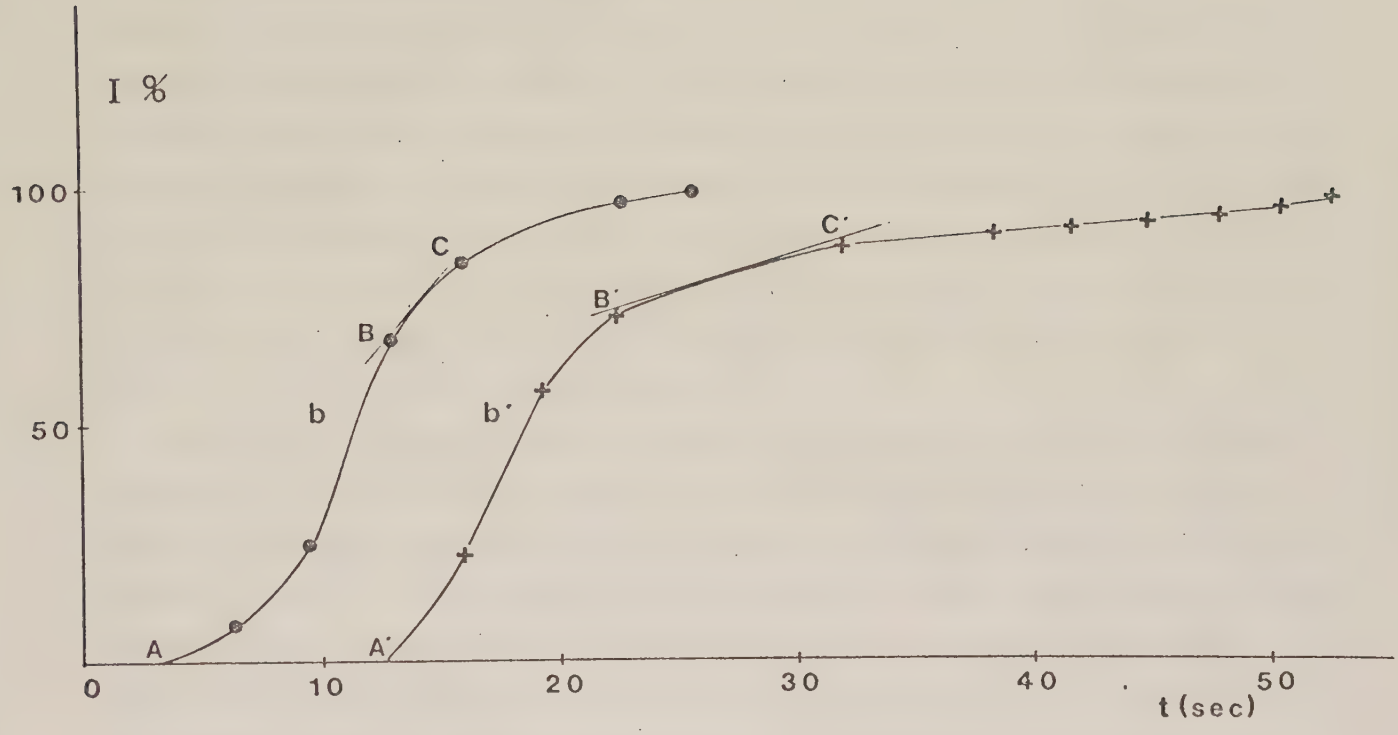


Figure 30 - Représentation des augmentations d'amplitude du courant sodium global en fonction du temps :

Courbe "b" : en Ringer normal.

Courbe "b'" : en Ringer normal additionné de dextrane.

(courbe "a' ", figure 29) et en 55 secondes (courbe "b' ",figure 30).

Analyse des courbes "a" (Ringer normal) et "a' " (RN + dextrane), figure 29.

Les deux courbes présentent :

- une phase ascendante rapide de même pente qui correspond au rétablissement du courant sodium de surface à une amplitude assez proche de son amplitude maximum de référence, dès qu'une solution de concentration sodique normale est rétablie. Le temps "zéro" étant pris au moment où le robinet permettant le changement de solution est manoeuvré, il est normal d'avoir un décalage dans le temps des phases rapides de ces courbes : ce décalage correspond au fait que la solution de viscosité élevée circule plus lentement par rapport à la solution normale dans le catheter reliant le réservoir de solution au compartiment test.

- une phase d'augmentation plus lente d'amplitude du courant, de pente différente ; on note que la pente la plus forte (courbe "a") correspond au retour en Ringer normal alors que la pente plus faible (courbe "a' ") coresponde au retour en solution de viscosité élevée. Pendant cette phase, le courant sodium de la paroi tubulaire se développe et s'ajoute au courant de surface mais si la diffusion du sodium dans les tubules n'était pas retardée par le dextrane, les phases B-C et B'-C' devraient avoir la même pente.

Analyse des courbes "b" (Ringer normal) et "b' " (RN + dextrane), figure 30.

Comme les précédentes, ces courbes présentent une phase rapide (A-B et A'-B') interprétée de façon analogue et une phase plus lente (B-C et B'-C') dont les pentes sont plus nettement différentes.

3) Effet de solutions de haute viscosité sur le rétablissement du courant sodium de fibre détubulée.

Des expériences suivant le même protocole expérimental sont réalisées sur des fibres détubulées.

La figure 31 montre que le rétablissement du courant sodium s'effectue suivant un décours temporel identique en solution de Ringer normal sans dextrane ou additionné de dextrane.

DISCUSSION.

Les résultats présentés dans ce chapitre s'écartent des données expérimentales classiques concernant le courant sodium de la fibre musculaire squelettique de Grenouille. Cependant, nous relevons dans le travail présenté par MOORE en 1972 un tracé de courant dont la phase d'inactivation

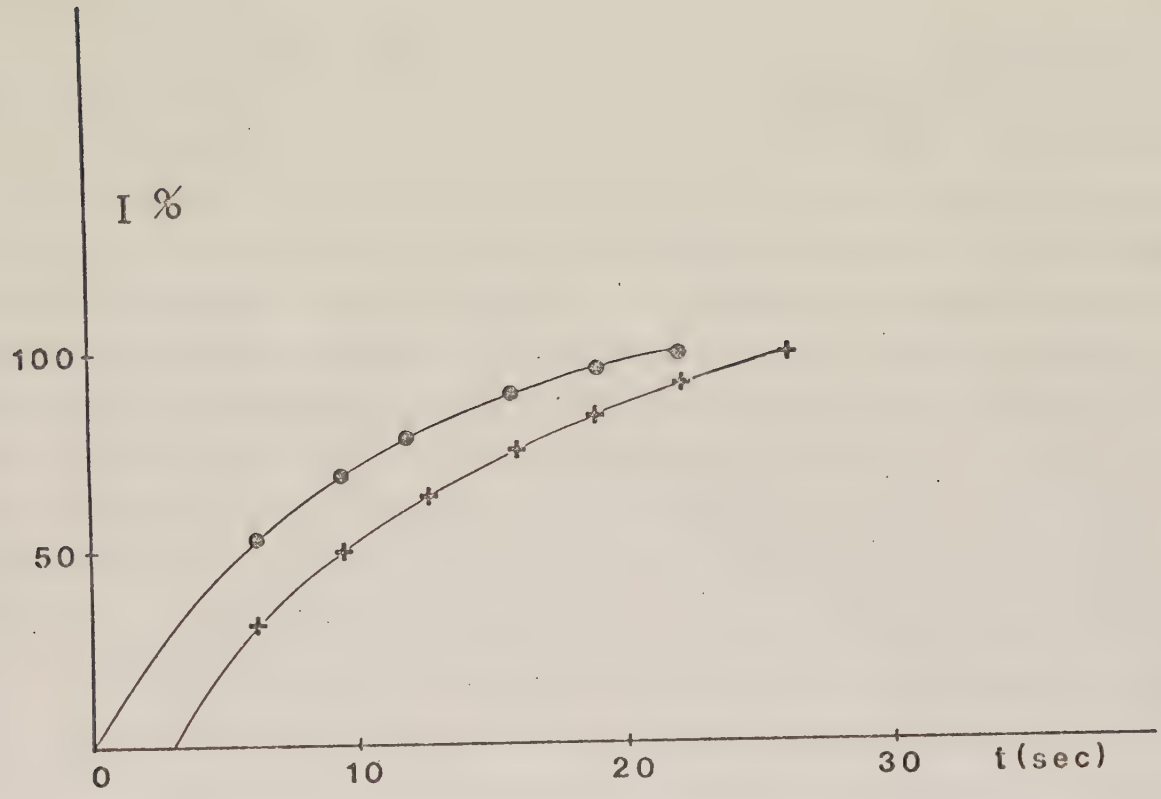


Figure 31 - Représentation des augmentations d'amplitude, en fonction du temps, du courant sodium d'une fibre détubulée.

(⊙) : en Ringer normal.

(+) : en Ringer normal additionné de dextrane.

montre, perturbant l'habituel décours exponentiel, un ressaut de courant dans le sens entrant ("notch") que l'auteur suppose lié à un problème de "space-clamp".

Nos résultats sont aussi en désaccord avec les conclusions tirées par ADRIAN et PEACHEY (1973) de l'étude du modèle qu'ils ont récemment proposé.

Il n'est donc pas inutile de discuter sur le plan technique comme sur le plan théorique les résultats que nous venons de rapporter.

L'utilisation de la technique de double séparation par le saccharose pour la mesure des courants ioniques en condition de potentiel imposé est, comme le mentionnent ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970), mieux adaptée à l'étude des courants rapides que la technique d'enregistrement par microélectrodes intracellulaires. Cependant, l'une des difficultés de la technique de "double sucrose-gap" est la réalisation d'un bon isolement entre le compartiment central et les compartiments latéraux. Si un bon isolement n'est pas réalisé, le maintien d'un potentiel de membrane constant au niveau de la portion de membrane étudiée n'est plus possible et, dans ces conditions, une activité répétée de la fibre, pour des dépolarisation suffisamment élevées, peut donner l'illusion d'un double courant sodium.

Nous pensons que l'intervention d'un tel artefact dans nos expériences doit pouvoir être écartée en raison des arguments suivants.

En cas de mauvais bridage du potentiel de membrane, le "courant" sodium apparent, résultant de la naissance d'un potentiel d'action, s'établit de façon brusque, pratiquement par tout ou rien lorsque la dépolarisation augmente. Or, nous avons toujours vérifié, dans nos expériences, la croissance progressive du courant sodium avec la dépolarisation imposée.

Par ailleurs, il serait extrêmement étonnant que si un défaut de technique tel que celui que nous évoquons soit responsable du double courant sodium que nous avons décrit, on ne le rencontre jamais dans les expériences que nous avons effectuées sur fibres détubulées.

S'il apparaît donc clairement que la dualité du courant sodium est une réalité expérimentale, il convient d'examiner brièvement les raisons pour lesquelles le modèle d' ADRIAN et PEACHEY (1973), dans sa forme actuelle, donne une reconstruction des courants ioniques de la fibre squelettique dans laquelle les phénomènes que nous avons décrits n'apparaissent pas, bien que ce modèle prévoit effectivement une membrane tubulaire excitable.

Les auteurs résument ainsi leurs conclusions : "How far is one misled by supposing that the current required to clamp the surface with its

attached tubules is the current passing accross a membrane consisting of a capacity, a leak, a sodium system (m, h), and a potassium system (n) ? ADRIAN et al. (1970) made this assumption in their analysis of the voltage clamp currents of striated muscle fibres. The major source of error is neglect of the tubular capacity current. Neglecting the tubular sodium current makes surprinsingly little difference".

Si le courant sodium tubulaire peut être négligé, dans le modèle d' ADRIAN et PEACHEY, sans qu'il s'ensuive de différence sensible sur le courant global, c'est sans doute en raison du fait que dans le modèle proposé, si la capacité de l'unité de surface tubulaire est supposée avoir la même valeur que la capacité de la membrane de surface, toutes les conductances ioniques tubulaires et, en particulier, la conductance sodium, sont considérablement réduites par rapport à celles de la membrane superficielle. Ainsi, la conductance sodique maximum $\bar{g}_{Na}$ est prise comme étant égale à 9 mmho. cm^{-2} pour le tubule contre 180 mmho. cm^{-2} pour la membrane de surface. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que le courant capacitif tubulaire ait une influence prépondérante sur le courant total.

Nous pensons d'ailleurs que le présent travail, strictement expérimental à son stade actuel, devrait être complété sur le plan de la modélisation.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'INACTIVATION DU SYSTEME SODIQUE.

1) Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

a) Cas d'un courant sodium global.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

2) Effet de préhyperpolarisations en présence de tétraéthylammonium.

a) Cas d'un courant sodium global.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

3) Effet de préhyperpolarisations en milieu sans potassium.

a) Cas d'un courant sodium global.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

DISCUSSION

Le processus d'inactivation du système sodique a été étudié quantitativement par HODGKIN et HUXLEY sur l'axone géant de Calmar par la méthode de la double impulsion : une longue préimpulsion de durée fixe (environ 50 ms) et d'amplitude variable permettant de modifier le potentiel de membrane au repos dans un sens hyperpolarisant ou dépolarisant, précède une impulsion test, brève et dépolarisante dont la valeur correspond au courant sodium maximum en absence de préimpulsion (environ +50 mV). L'amplitude du courant sodium est mesurée pour différentes valeurs du potentiel de membrane préalablement imposé. Nous avons donné précédemment (figure 4 - chapitre Historique) la relation h_∞ - potentiel établie par ces auteurs sur cette structure.

Sur la fibre musculaire striée, ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970), ILDEFONSE (1970) obtiennent les courbes h_∞ - potentiel présentées sur la figure 32.

Lorsque la membrane est prédépolarisée, le courant sodium diminue rapidement et s'annule pour une variation de potentiel V de +30 à +40 mV. Le potentiel de membrane correspondant à la demi-inactivation ($h_\infty = 0,5$) est égal à -70 mV selon ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN ; ILDEFONSE indique que la demi-inactivation est obtenue avec une prédépolarisation V de +11 mV.

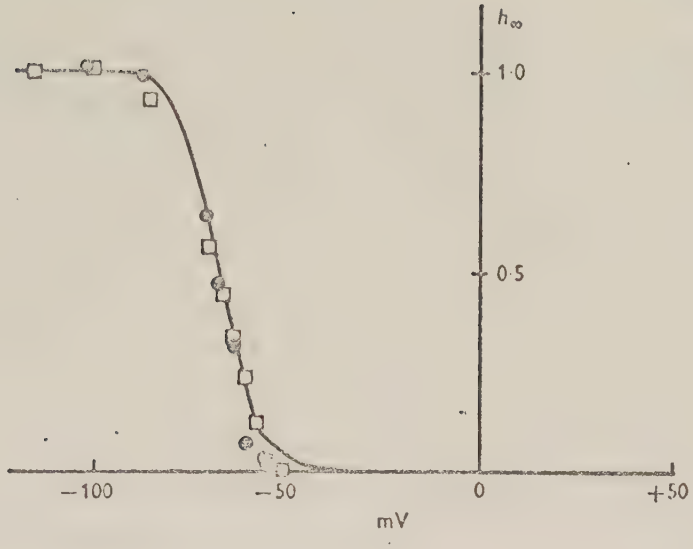
Suivant ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN, au potentiel de repos, h_∞ est égal à 1 tandis qu' ILDEFONSE donne une valeur légèrement plus faible ($h_\infty = 0,9$) à ce niveau de potentiel.

Lorsque la membrane est préhyperpolarisée d'environ -15 mV, le courant déjà totalement activé au potentiel de repos reste constant (ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN) ou, légèrement inactivé au potentiel de repos, augmente et atteint sa valeur maximum pour cette variation de potentiel (ILDEFONSE).

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus en étudiant les effets sur le système sodique de préhyperpolarisations dans une gamme élevée ; les variations de potentiel imposées à la membrane avant la dépolarisation test sont comprises entre zéro et -60 à -90 mV.

L'effet de prédépolarisations a, dans tous les cas, été également testé. Nos résultats sont globalement en accord avec ceux d'ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN et d' ILDEFONSE concernant la valeur du potentiel de demi-inactivation ainsi que le niveau de potentiel pour lequel le courant sodium est annulé.

Nous avons vu dans le précédent chapitre que, lors de dépolari-



A

B

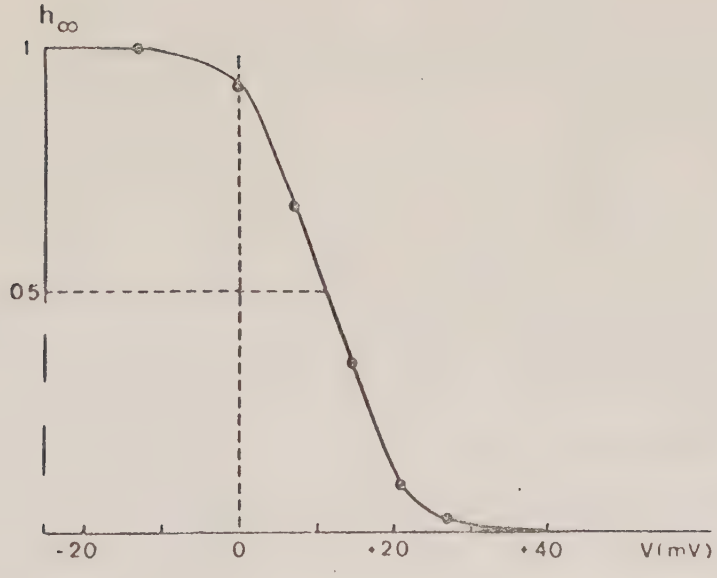


Figure 32 - Courbes h∞ - potentiel.

d'après ILDEFONSE (1970) B

d'après ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970) A

sations imposées, l'activité du système sodique de la fibre musculaire striée -système tubulaire transverse intact- se traduit soit par le développement d'un seul courant à double composante de surface et tubulaire, soit par le développement de deux courants distincts attribués chronologiquement à la membrane de surface et à la paroi tubulaire. L'effet de préhyperpolarisations de valeur élevée a donc été étudié dans les deux cas.

Dans nos expériences, la durée de la préimpulsion hyperpolarisante ou dépolarisante, d'amplitude variable, est le plus souvent égale à 50 ms, quelquefois à 60 ou 80 ms ; l'impulsion test dépolarisante de durée comprise entre 5 et 10 ms a une amplitude correspondant au courant sodium maximum en absence de préimpulsion, soit environ +50 mV. Nous avons toujours vérifié que le courant sodium provoqué par l'impulsion-test appliquée isolément restait constant pendant toute la durée de l'expérience, sinon les résultats n'étaient pas retenus.

1) Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

a) Cas d'un courant sodium global.

L'effet de prédépolarisations sur l'amplitude du courant ayant toujours été étudié, nous indiquons sur le Tableau I les valeurs du potentiel correspondant à la demi-inactivation ($h_\infty = 0,5$), la valeur de h_∞ au potentiel de repos et le niveau de potentiel pour lequel le courant est annulé.

Dans la plupart des cas, h_∞ est égal à 1 au potentiel de repos et la variation de potentiel correspondant à la demi-inactivation est d'environ +20 mV ($E \approx -70$ mV) : ces résultats sont en accord avec ceux d'ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970) ; dans quelques cas, h_∞ est compris entre 0,9 et 1 au potentiel de repos et la demi-inactivation obtenue pour une dépolarisation se situant entre +10 et +15 mV : ces résultats sont proches de ceux donnés par ILDEFONSE (1970). Ces deux types de résultats sont montrés par les figures 33 et 35.

Cette légère divergence entre nos deux séries de résultats pourrait s'expliquer en supposant que la valeur du potentiel de repos, pour ces quelques cas, est un peu inférieure à la valeur théorique de -90 mV. Cette conclusion proposée par ILDEFONSE (1970) nous semble pouvoir être reprise ici.

Sous l'effet de préimpulsions hyperpolarisantes, nous avons toujours observé une diminution du courant sodium global avec l'augmentation du potentiel de membrane.

Cette diminution présente soit un caractère diphasique soit plus

TABLEAU I

V pour h=0,5	h_∞ à E_R	V' pour $I_{Na}=0$
+ 20 mV	1	+ 35 mV
+ 25 mV	1	+ 34 mV
+ 23 mV	1	+ 42 mV
+ 18 mV	1	+ 30 mV
+ 15 mV	0,9	+ 30 mV
+ 10 mV	0,9	+ 25 mV
+ 29 mV	1	+ 45 mV
+ 14 mV	0,9	+ 30 mV
+ 20 mV	1	+ 30 mV
+ 20 mV	1	+ 38 mV
+ 12 mV	0,98	+ 25 mV

Valeur de la variation de potentiel V correspondant à $h = 0,5$.

Valeur de h_∞ au potentiel de repos E_R .

Valeur de la variation de potentiel V' pour laquelle le courant sodium est annulé.

Courant sodium global

fréquemment un caractère monophasique.

Le premier cas est illustré par la figure 33 : le courant diminue d'abord rapidement entre zéro et -30 mV d'hyperpolarisation ; cette phase de décroissance rapide est suivie d'une phase de décroissance plus lente. Le deuxième cas est présenté sur la figure 34 : le courant diminue en fonction des prépotentiels en une seule phase.

Pour les deux exemples illustrés par les figures 33 et 34, h_∞ est égal à 1 au potentiel de repos.

La courbe h_∞-potentiel (figure 35) extraite d'une autre expérience montre, comme cela a été quelquefois observé, une légère inactivation du courant : au potentiel de repos, h_∞ est égal à 0, 94. On peut noter aussi, sur cette courbe, une diminution du courant moins importante que dans les deux exemples précédents. En effet, le pourcentage de diminution du courant n'est pas constant d'une préparation à l'autre ; les valeurs obtenues vont de 10 à 60% : sur 65% des fibres étudiées, la diminution est comprise entre 10 et 30%, elle va de 30 à 60% pour seulement 35% des préparations testées.

Résumé.

La diminution du courant sodium global, sous l'effet de préhyperpolarisations, est caractérisée par un décours monophasique ou diphasique.

Cette diminution est quantitativement variable suivant les préparations.

Au potentiel de repos, h_∞ est en général égal à 1 ; le potentiel de demi-inactivation ($h_\infty = 0, 5$) est d'environ - 70 mV.

La figure 36 (courbes 33, 34 et 35 superposées) illustre l'ensemble des résultats obtenus.

Nous supposons que cette diminution concerne la composante tubulaire du courant global, hypothèse corroborée par les résultats suivants.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

L'effet de prédépolarisations est également toujours étudié aussi bien sur le courant initial que sur le courant tardif.

Sur le tableau II, sont indiquées les valeurs de la variation de potentiel V donnant la demi-inactivation, de h_∞ au potentiel de repos ainsi que du niveau de potentiel V' pour lequel les courants sont annulés.

Le courant tardif est totalement activé au potentiel de repos où h_∞ est égal à 1 ; le courant initial, légèrement inactivé (h_∞ compris entre 0, 92 et 0, 98). Pour les deux courants, la demi-inactivation est obtenue

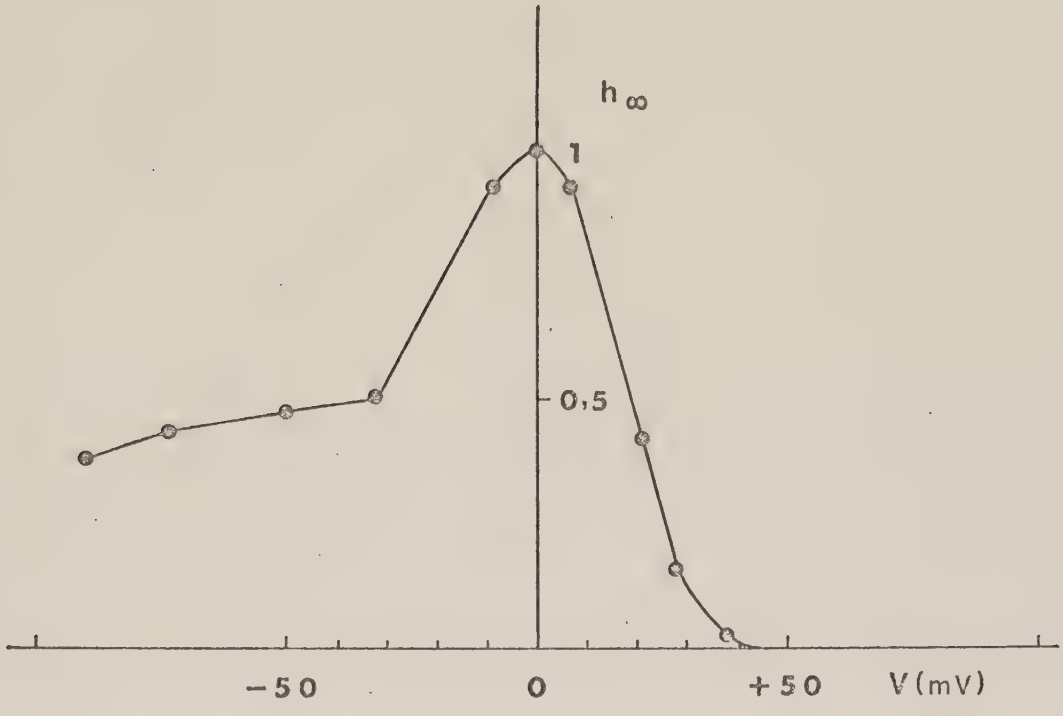


Figure 33 - Courbe h_∞ - potentiel obtenue pour le courant sodium global en milieu de Ringer normal.

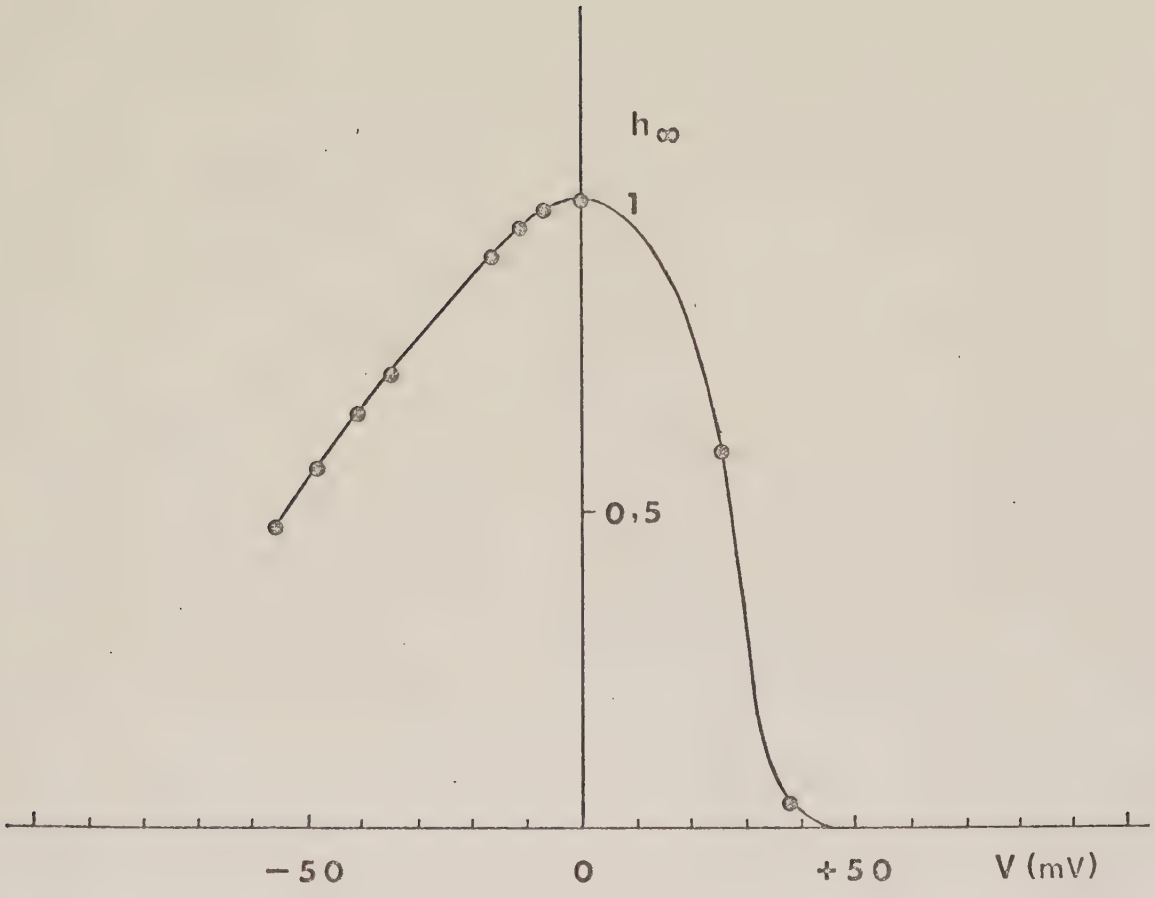


Figure 34 - Courbe h∞ - potentiel obtenue pour le courant sodium global en milieu de Ringer normal.

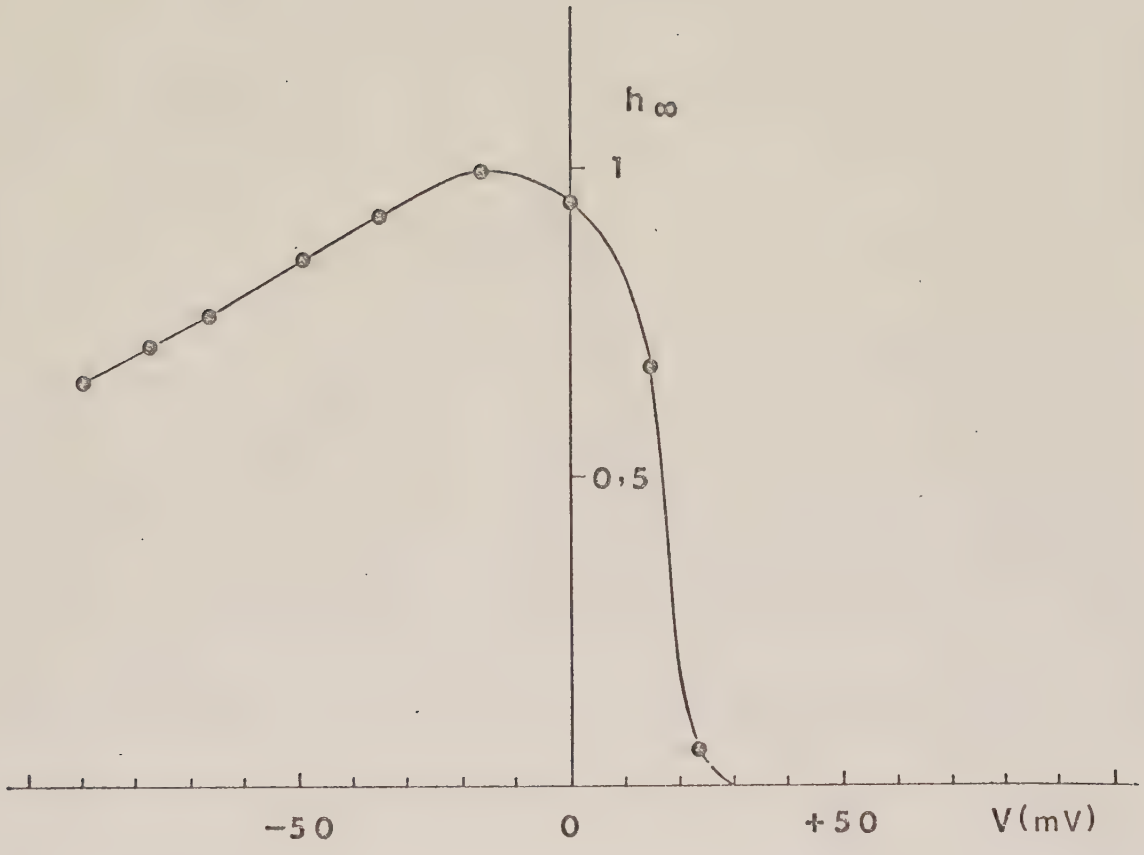


Figure 35 - Courbe h_∞ - potentiel obtenue pour le courant sodium global en milieu de Ringer normal.

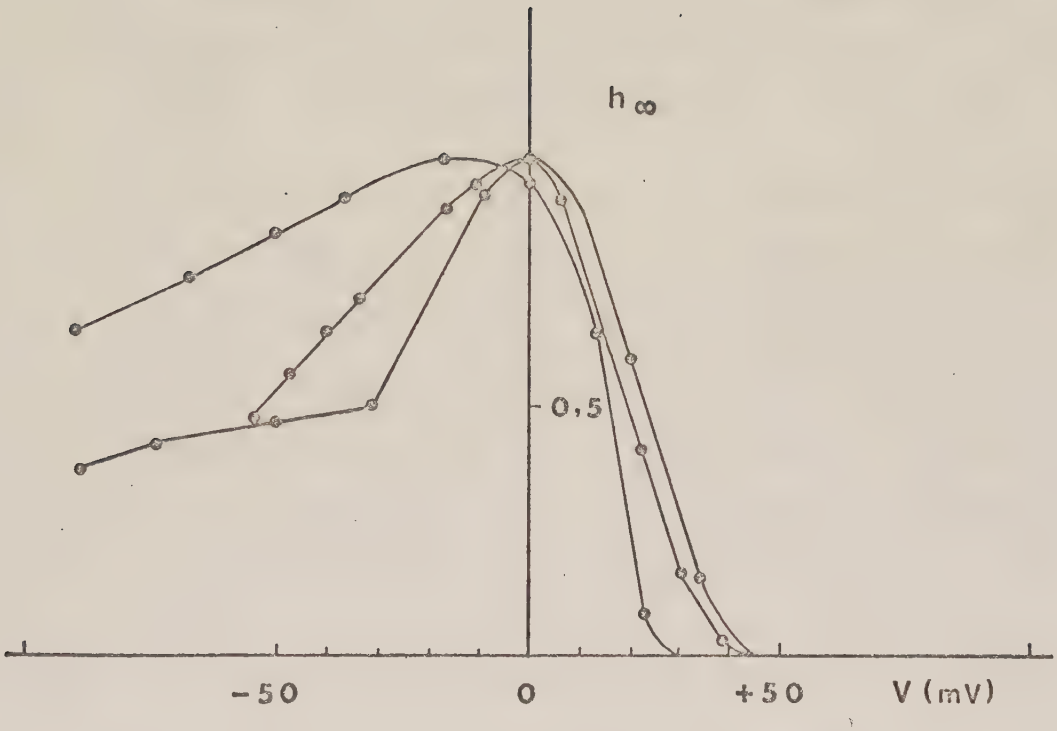


Figure 36 - Superposition des courbes h∞ - potentiel des figures 33, 34 et 35.

TABLEAU II

V pour h=0,5		h∞ à E_R		V' pour I_{Na} = 0	
I_{Na}(S)	I_{Na}(T)	I_{Na}(S)	I_{Na}(T)	(S)	(T)
+19 mV	+19 mV	0,94	1	+35 mV	+35 mV
+21 mV	+23 mV	0,98	1	+36 mV	+38 mV
+24 mV	+25 mV	0,92	1	+47 mV	+36 mV
+12 mV	+20 mV	0,92	1	+27 mV	+35 mV
+15 mV	+18 mV	0,94	1	+26 mV	+29 mV
+13 mV	+19 mV	0,91	1	+30 mV	+30 mV

I_{Na}(S) = Courant sodium de surface

I_{Na}(T) = Courant sodium "tardif" tubulaire.

Valeur de la variation de potentiel V correspondant à h = 0,5.
Valeur de h au potentiel de repos.
Valeur de la variation de potentiel V' pour laquelle les courants sodium sont annulés.

pour une variation de potentiel comprise entre +12 et +25 mV.

Le courant tardif évolue donc en fonction de prédépolarisations comme le courant initial.

L'étude des effets de préhyperpolarisations dans la même gamme d'amplitudes que précédemment fait apparaître une nette divergence dans l'évolution des deux courants.

Le courant initial, légèrement inactivé au potentiel de repos, augmente et atteint son amplitude maximum pour une variation de potentiel comprise entre -8 et -15 mV. Il se maintient ensuite à une amplitude constante même pour des préhyperpolarisations de valeur élevée (figures 37, 38 et 39).

Le courant tardif est toujours diminué lorsque la membrane est préhyperpolarisée.

Comme dans le cas d'un courant sodium global, cette diminution présente soit un caractère diphasique soit un caractère monophasique.

Le premier cas est illustré par la figure 37 : la diminution du courant d'abord rapide, devient plus lente à partir d'une préhyperpolarisation de -30 mV. Le deuxième cas est représenté sur les figures 38 et 39 : le courant diminue régulièrement en une seule phase. On remarque, sur ces deux figures, que la diminution du courant tardif, comme celle du courant global, est plus ou moins marqué suivant les préparations : les valeurs obtenues vont de 20 à 50% de diminution maximum par rapport à l'amplitude de référence.

La figure 40 (courbes 37, 38 et 39 superposées) illustre l'ensemble des résultats obtenus.

Résumé.

Sous l'effet de préhyperpolarisations de la membrane, le courant initial, après une légère augmentation, se maintient à une amplitude constante tandis que le courant tardif est toujours diminué.

La comparaison des figures 36 et 40 montre la similitude des courbes h_∞ - potentiel obtenues pour le courant sodium global et pour le courant entrant tardif. C'est donc bien la composante de courant d'origine tubulaire qui est diminuée dans le cas d'un courant global.

L'effet de préhyperpolarisations se manifeste donc d'une façon très différente sur le courant sodium initial concernant la membrane de surface et sur le courant tardif attribué à la paroi tubulaire.

Les tubules transverses étant ouverts sur le milieu extracellulaire, la concentration en sodium dans la lumière tubulaire est donc la même que celle de la solution de Ringer normal circulant dans le compar-

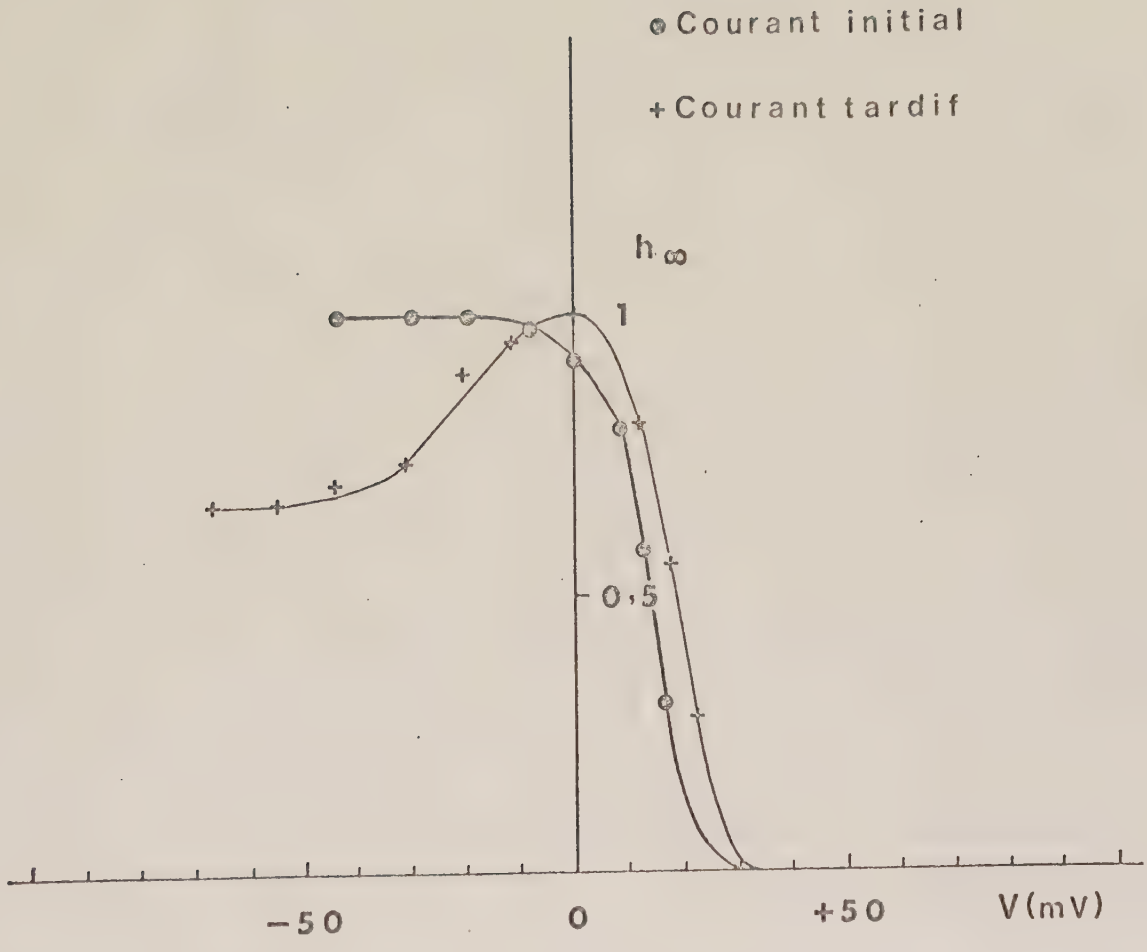


Figure 37 - Courbes h∞ - potentiel obtenues en milieu de Ringer normal pour le courant initial et le courant tardif.

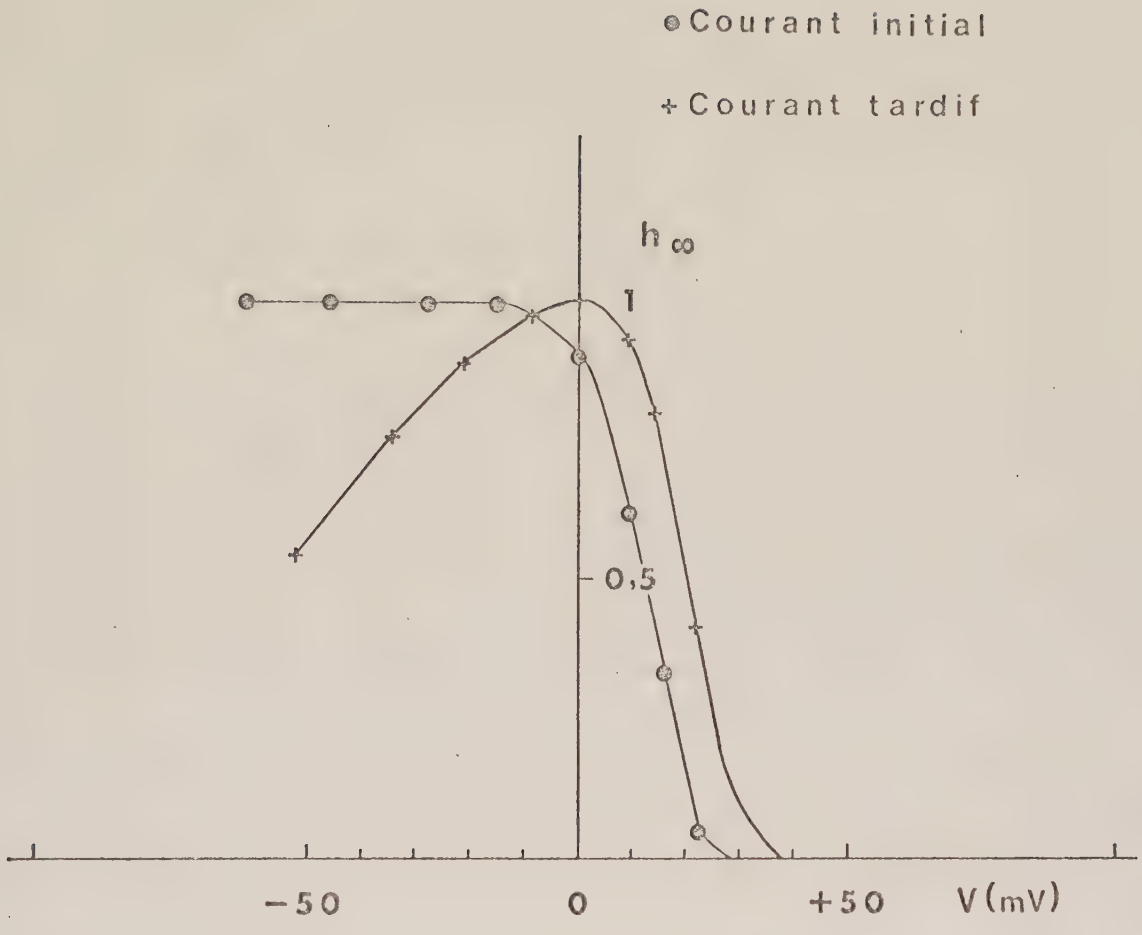


Figure 38 - Courbes h_∞ - potentiel obtenues en milieu de Ringer normal pour le courant initial et le courant tardif.

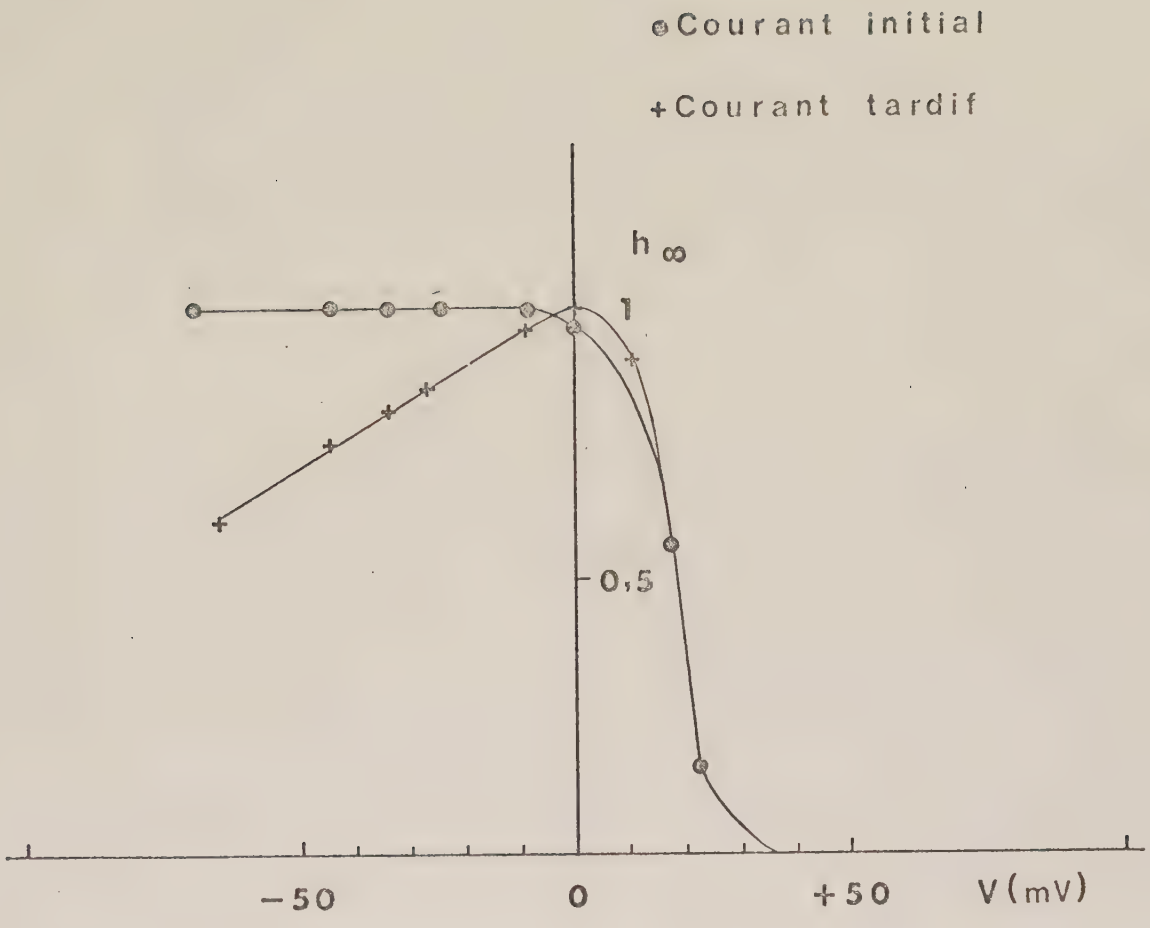


Figure 39 - Courbes h∞ - potentiel obtenues en milieu de Ringer normal pour le courant initial et le courant tardif.

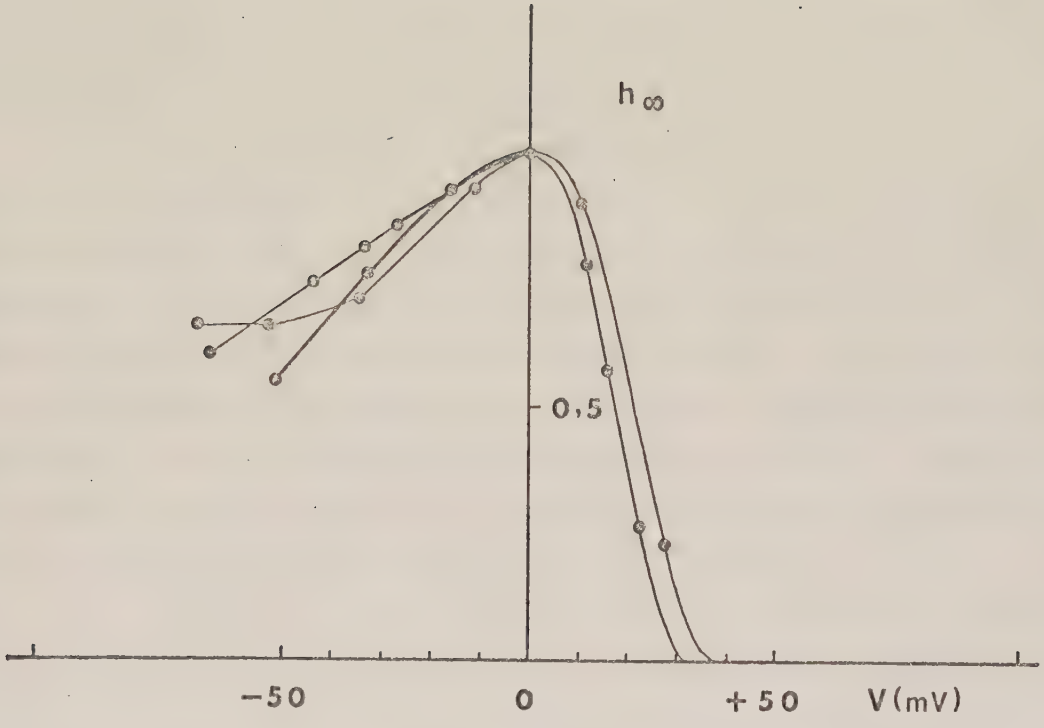


Figure 40 - Superposition des courbes h∞ - potentiel des figures 37, 38 et 39.

timent test. Par contre, la concentration en potassium à l'intérieur des tubules n'est pas constante pendant l'activité. ILDEFONSE et ROUGIER (1968) ont montré qu'une préhyperpolarisation, en diminuant la concentration en potassium dans les tubules, augmente le courant sortant retardé, car la "driving-force" ($E - E_K$) est augmentée ; il en résulte une accumulation de potassium qui à son tour inactive le courant sortant. ADRIAN et FREYGANG (1962 a) observent une diminution en fonction du temps de la conductance potassique g_K lorsque la membrane est hyperpolarisée par un courant entrant et supposent que cette chute de conductance est due à une diminution de la concentration en potassium dans le système T.

Plus récemment, ALMERS (1972 a et b) montre que l'inactivation du courant pendant une hyperpolarisation imposée traduit une diminution de la concentration en potassium dans les tubules pour des potentiels inférieurs à -120 mV ; au delà, doivent intervenir à la fois un "vidage" des tubules et un changement de perméabilité. BARRY et ADRIAN (1973) proposent une analyse mathématique des changements lents de la conductance potassique due à la diminution de concentration en ions K^+ dans les tubules et montrent que, au moins pour de petits changements de potentiel, il y a accord entre résultats théoriques et expérimentaux.

L'étude de l'inactivation du système sodique est donc réalisée dans des conditions telles que l'entrée d'ions potassium pendant la préhyperpolarisation et la sortie de potassium pendant la dépolarisation-test sont supprimées par le tetraéthylammonium (TEA), inhibiteur de la perméabilité potassique. KAO et STANFIELD (1970), STANFIELD (1969, 1970 a) ont, en effet, montré que cette substance bloquait la conductance potassique retardée de la fibre musculaire. STANFIELD (1970 b) conclut de ses expériences que le tetraéthylammonium réduit l'amplitude du courant entrant pendant une hyperpolarisation.

2) Effet de préhyperpolarisations en présence de tetraéthylammonium.

a) Cas d'un courant global.

Le tetraéthylammonium (TEA), sous forme de chlorure, est ajouté à la solution de Ringer à la concentration de 10 à 20 mM/l.

La figure 41 montre le décours des courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu normal et en présence de TEA. On observe qu'après addition de cet inhibiteur, le courant sodium diminue très peu et que la courbe est pratiquement horizontale pour la même gamme de préhyperpolarisations que celle étudiée en Ringer normal, de 0 à - 50 mV.

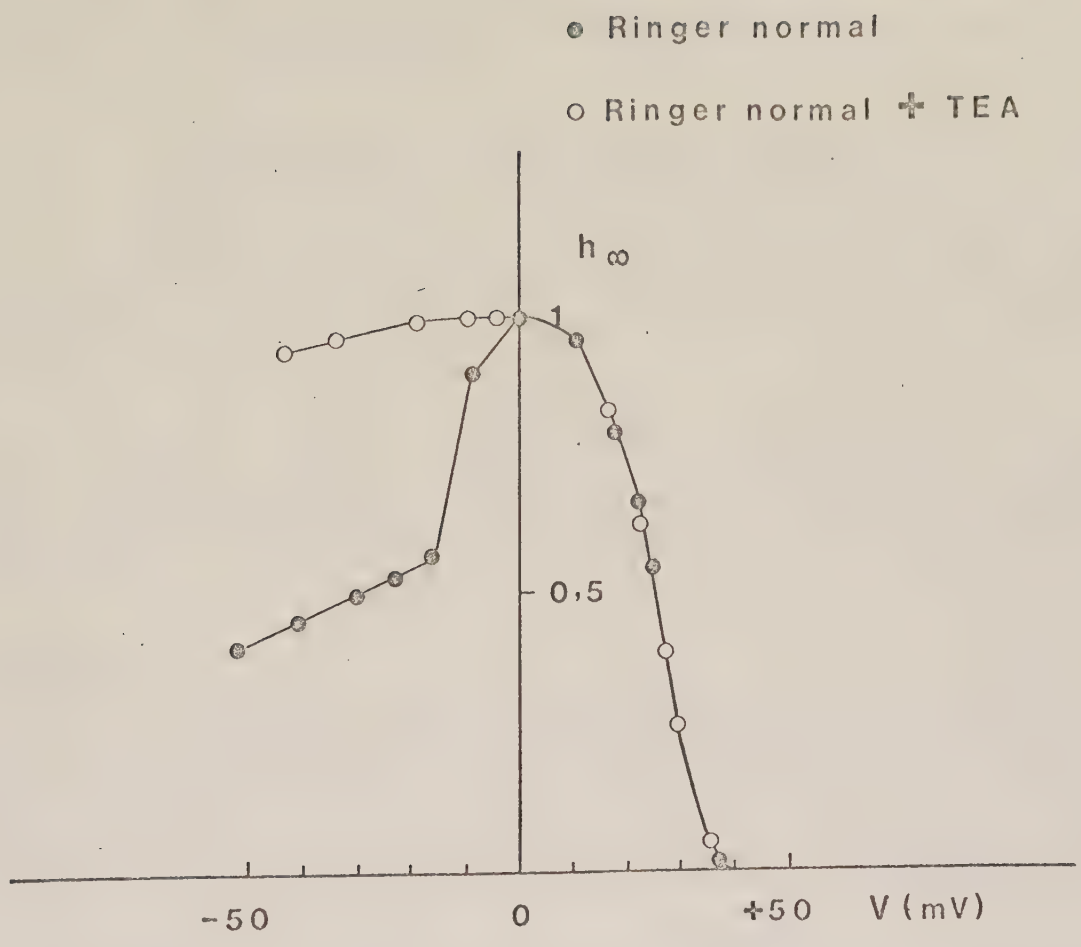


Figure 41 - Courbes h∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu de Ringer normal et en présence de TEA, pour le courant sodium global.

Un autre exemple est illustré par la figure 42 : en Ringer normal, la diminution du courant est ici de type monophasique ; en présence de TEA, le courant reste constant à partie de - 9 mV.

Quand la membrane est préalablement dépolarisée, le courant est inactivé de la même façon que la fibre soit lavée en Ringer normal ou soit soumise à l'effet du TEA.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

Les figures 43 et 44 illustrent les résultats obtenus. En présence de tetraéthylammonium, le courant tardif garde une amplitude constante (figure 43) ou présente une très faible diminution (figure 44) lorsqu'on préhyperpolarise la membrane.

On ne note pas de différences significatives en ce qui concerne l'inactivation du courant tardif sous l'effet de préimpulsions dépolarisantes, en passant du milieu de Ringer normal à la solution additionnée de TEA.

Résumé.

En présence de tetraéthylammonium (TEA), inhibiteur de la perméabilité potassique, le courant sodium global ainsi que le courant entrant tardif ne présentent plus la diminution d'amplitude observée en milieu normal lorsque la membrane est préalablement hyperpolarisée.

3) Effet de préhyperpolarisations en milieu sans potassium.

a) Cas d'un courant sodium global.

La figure 45 montre les courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même préparation en milieu normal puis en solution dépourvue de potassium.

Les enregistrements en milieu sans potassium sont pris 10 minutes environ après le changement de solutions.

On constate que le courant, légèrement inactivé au potentiel de repos, atteint son amplitude maximum pour une préimpulsion de -15 mV et conserve ensuite une amplitude constante.

b) Cas de deux courants sodium distincts.

L'absence de potassium dans le milieu extérieur est testée sur l'évolution du courant entrant tardif, lors des préhyperpolarisations ; une

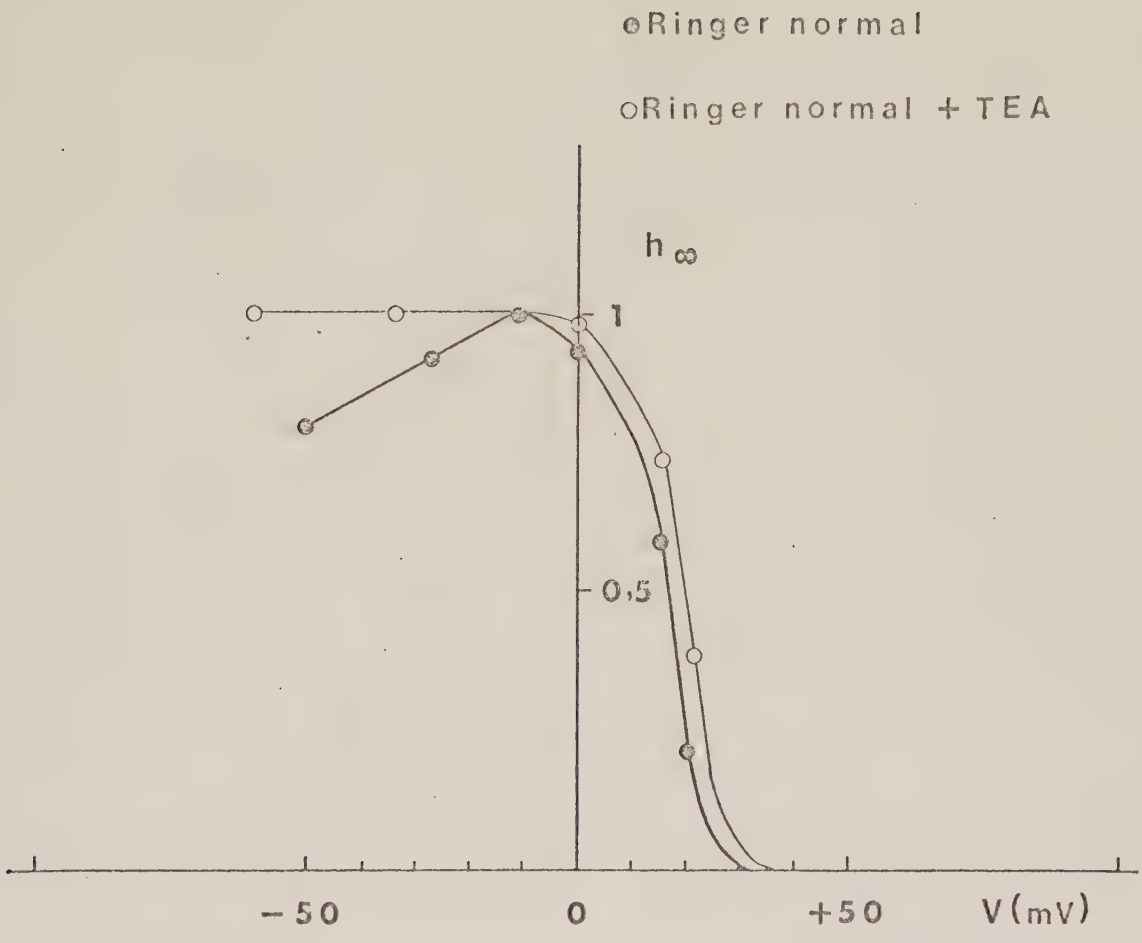


Figure 42 - Courbes h∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu de Ringer normal et en présence de TEA, pour le courant sodium global.

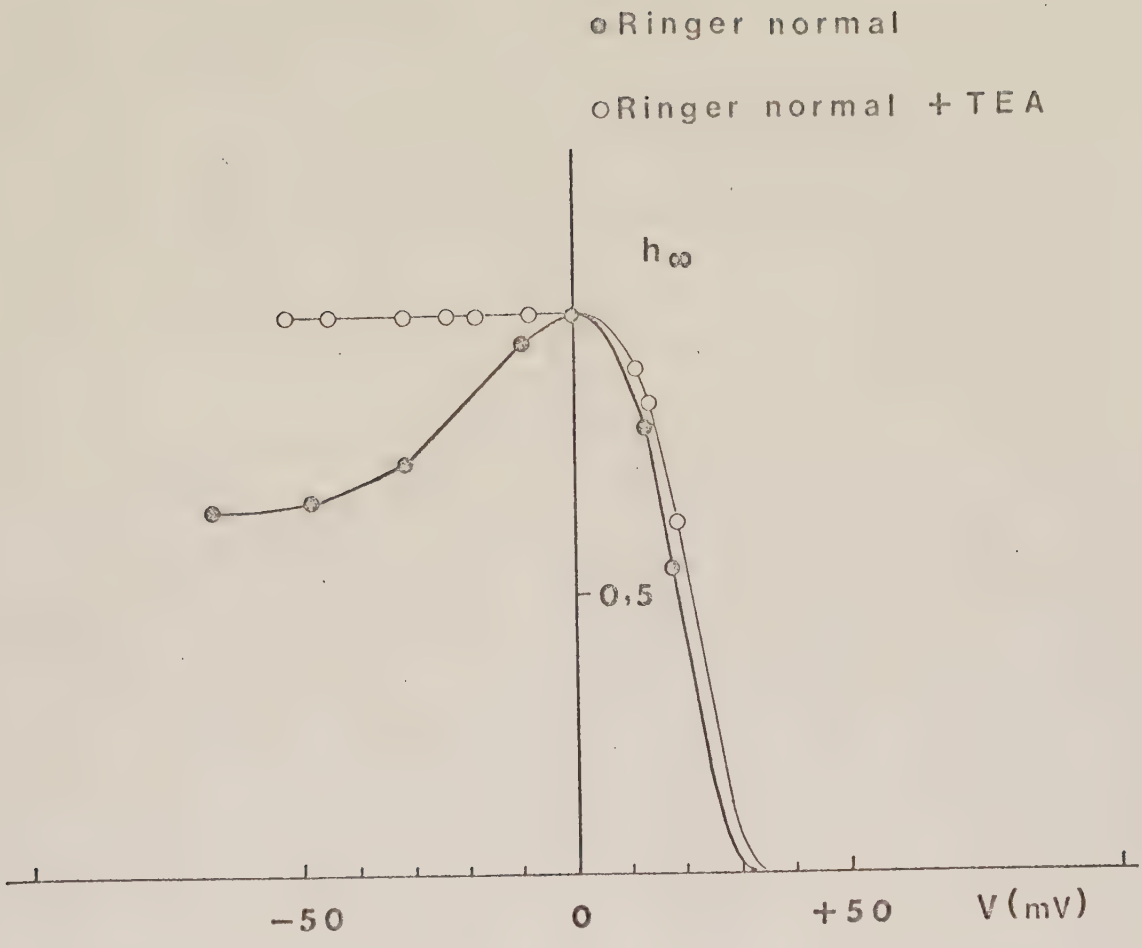


Figure 43 - Courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu de Ringer normal et en présence de TEA, pour le courant entrant tardif.

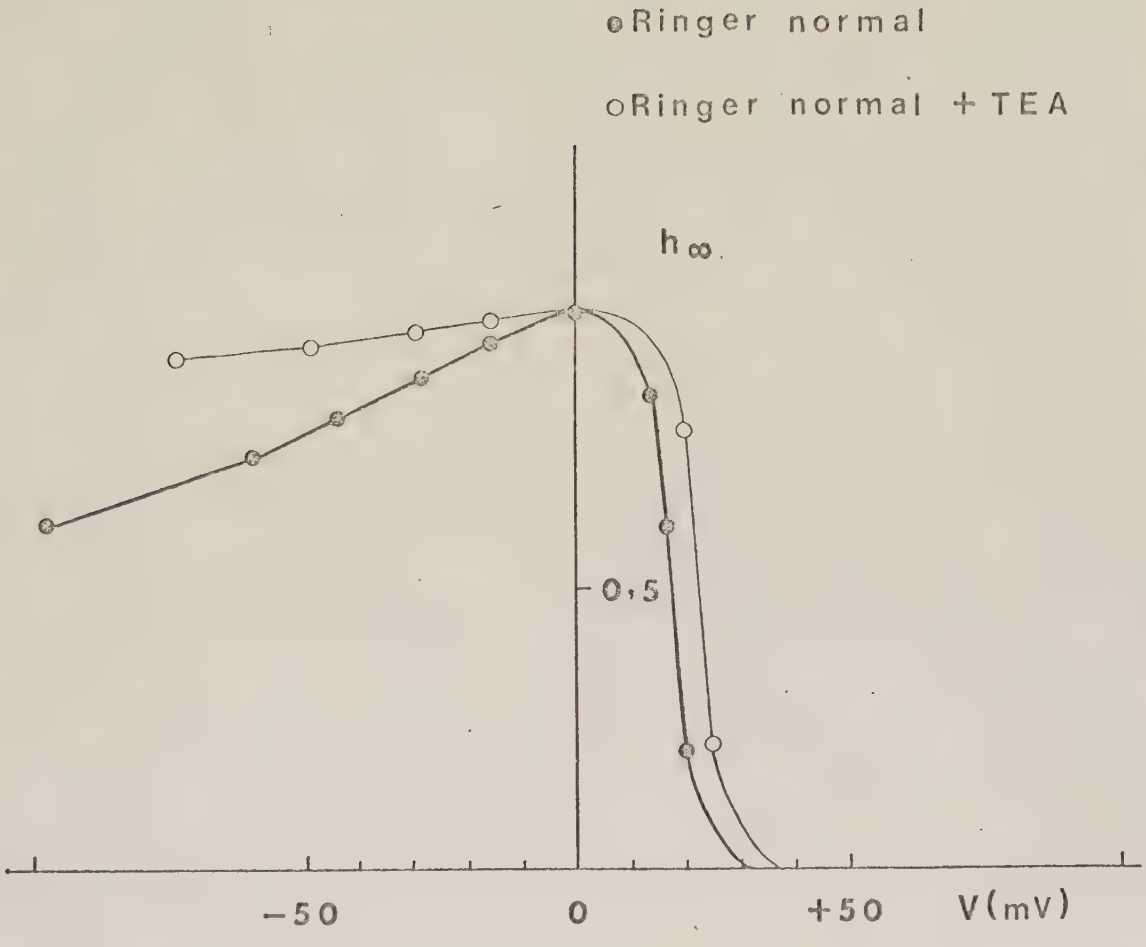


Figure 44 - Courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu de Ringer normal et en présence de TEA, pour le courant entrant tardif.

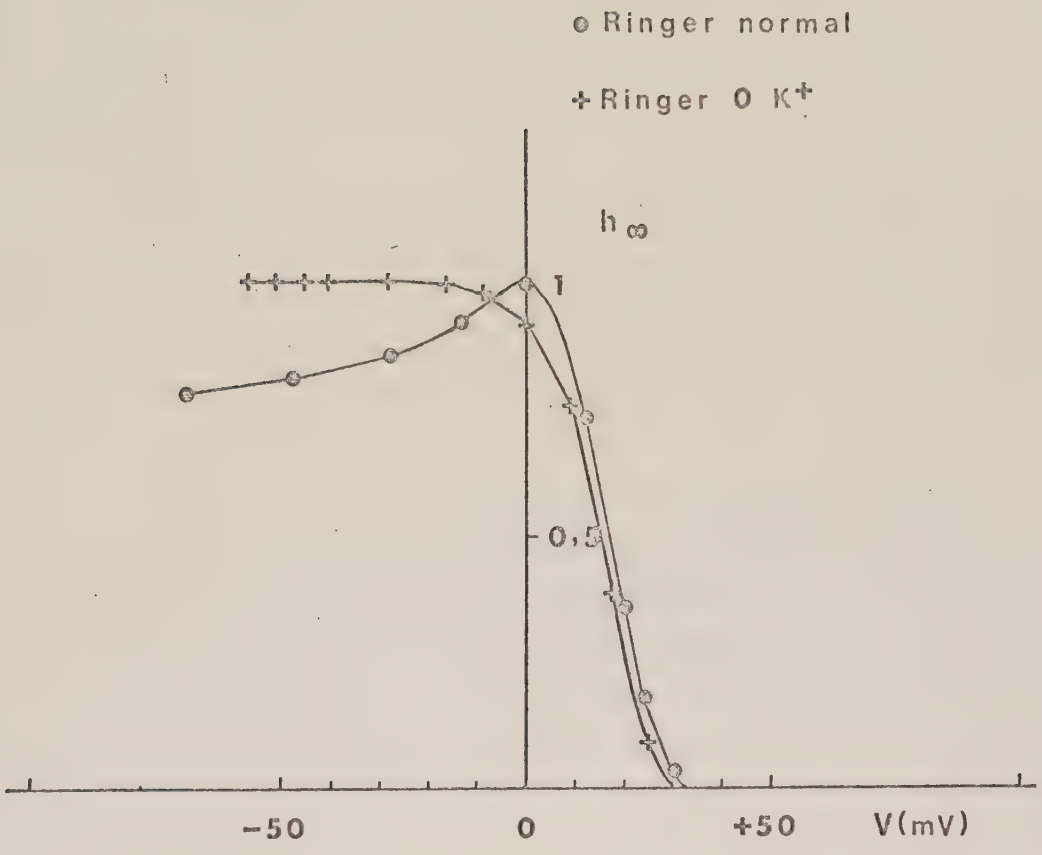


Figure 45 - Courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu normal et en milieu sans potassium, pour le courant sodium global.

faible diminution persiste dans ce cas mais comme l'indique la figure 46, elle n'est plus que de 9% alors qu'elle était de 35% en milieu normal.

Résumé.

Comme le TEA, l'absence de potassium dans la solution de Ringer supprime la diminution du courant sodium global ou du courant tardif.

DISCUSSION.

L'action du TEA de même que l'effet d'un milieu dépourvu de potassium sur le phénomène observé impliquent que des changements de la conductance potassique au niveau de la paroi tubulaire, résultant de modifications de la concentration en potassium dans la lumière des tubules, doivent intervenir pendant la phase de courant entrant se développant au niveau de cette structure.

En raison précisément de l'effet du tetraéthylammonium, il nous semble justifié d'exclure la possibilité que le courant capacitif, courant sortant pendant une dépolarisation, soit responsable de la diminution du courant entrant. Cette hypothèse aurait pu être envisagée car le courant capacitif présente une importante composante tubulaire susceptible d'interférer avec le courant entrant : en effet, ADRIAN et PEACHEY (1973) calculant les courants de membrane, courant total et courant de surface, pour différents niveaux de potentiel, montrent que le courant total est toujours inférieur au courant de surface en raison de l'existence du courant capacitif tubulaire qui est sortant pendant une dépolarisation. Par suite, le courant entrant que nous mesurons pendant la dépolarisation test pourrait en fait être diminué si l'on suppose que le courant capacitif tubulaire n'est pas nul au temps correspondant au pic de courant entrant. Cette phase terminale du courant capacitif, contemporaine du courant entrant, étant augmentée par suite de la plus grande variation de potentiel lorsque la membrane est soumise à des préhyperpolarisations croissantes, le courant entrant résultant aurait pu être ainsi progressivement diminué.

Cette hypothèse aurait pu expliquer la diminution du courant sodium global ; elle ne peut rendre compte des résultats obtenus dans le cas de deux courants entrants, puisque le courant initial reste constant et que seul le courant tardif est diminué. Par ailleurs, comme nous l'indiquons ci-dessus, la suppression par le tetraéthylammonium et l'absence de potassium du phénomène observé ne nous permet pas de faire intervenir cette composante de courant.

Par contre les courants sortants transportés par les ions po-

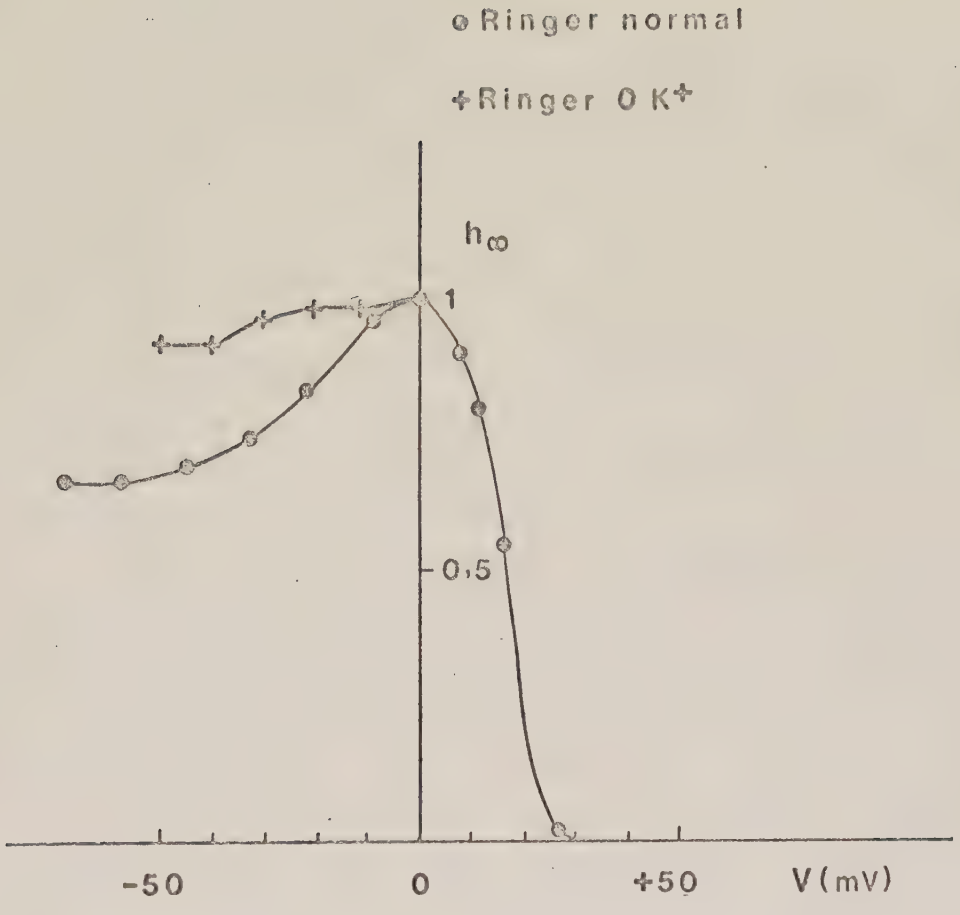


Figure 46 - Courbes h_∞ - potentiel obtenues sur la même fibre en milieu normal et en milieu sans potassium, pour le courant entrant tardif.

tassium peuvent être pris en considération dans la mesure où ils sont susceptibles d'être diminués par le TEA ou l'absence de potassium dans le milieu.

Plusieurs possibilités peuvent être envisagées :

a) Courant de fuite.

Le courant de fuite, sur la fibre musculaire striée, présente pour des dépolarisations supérieures à +50 mV une légère rectification qui pourrait traduire l'existence d'une composante potassique activable de ce courant comme le suggère ILDEFONSE (1970). Cette composante peut être, comme le courant potassique retardé, augmentée par suite de l'augmentation de la "driving-force" ($E - E_K$) due à une diminution de la concentration en potassium dans les tubules pendant la préhyperpolarisation. L'action du tetraéthylammonium s'expliquerait alors puisque cette substance à la concentration de 10 mM/l diminue la composante potassique du courant de fuite, sans l'annuler toutefois (ILDEFONSE, 1970).

Cependant, étant donné que l'amplitude de la dépolarisation imposée est, suivant notre protocole expérimental, égale ou très faiblement supérieure à +50 mV, il ne nous semble pas possible de faire intervenir cette composante potassique pratiquement nulle pour cette valeur de potentiel comme l'indiquent les tracés présentés par ILDEFONSE (1970).

Par ailleurs, en ce qui concerne la composante potassique non activable du courant de fuite, représentant environ 30% de celui-ci, il nous semble que, même passivement augmentée par l'augmentation de la "driving-force", donc sans changement de conductance, sa participation doit être quantitativement faible et qu'elle ne peut, à elle seule, rendre compte des diminutions du courant sodium observées.

b) Courant potassique retardé.

Comme le montrent les résultats déjà évoqués d' ILDEFONSE et ROUGIER (1968), la concentration en potassium dans les tubules est vraisemblablement diminuée pendant la préhyperpolarisation, ce qui en rendant le potentiel d'équilibre au potassium E_K plus négatif, augmente la "driving-force" ($E - E_K$) pour le courant sortant retardé qui est par suite augmenté. L'augmentation du courant sortant produit une accumulation de potassium dans les tubules : le courant I_K est alors inactivé par suite de la diminution de la "driving-force".

Cependant, pour pouvoir faire intervenir le courant sortant I_K pour rendre compte de la diminution du courant entrant I_{Na}, il faudrait supposer que ce courant sortant non seulement est augmenté mais aussi qu'il

se développe plus tôt, ce qui revient à dire que la conductance potassique g_K serait activée précocement ; de plus, le courant potassique sortant mesuré à la fin de la dépolarisation imposée devrait être sensiblement augmenté, ce qui n'est pas observé : une légère augmentation du courant potassique sortant est seulement enregistrée, ce qui signifie que le courant potassique sortant contemporain du courant entrant est rapidement inactivé.

Il semble ainsi difficile de concilier ce schéma avec les données de la théorie ionique qui prévoit que l'activation de la conductance g_K, lors d'une dépolarisation imposée, est retardée par rapport à celle de la conductance sodique. Une préhyperpolarisation de la membrane augmente le courant potassique sortant résultant de l'activation de cette conductance g_K mais ne doit pas, en principe, diminuer le délai d'activation de cette conductance g_K .

c) Courant potassique rapide et transitoire.

L'hypothèse qui nous paraît actuellement compatible avec les données expérimentales et théoriques consiste en l'existence d'un courant potassique rapide et transitoire, engendré par l'augmentation de la "driving-force" ($E - E_K$) et localisé par conséquent au niveau de la membrane tubulaire.

Un tel courant est observé par NEHER (1971) sur les cellules ganglionnaires d' Helix pomatia, structure dont le courant entrant calcique est également diminué sous l'effet de préhyperpolarisations membranaires. Ce courant potassique sortant, précoce et transitoire, est inactivé au potentiel de repos ; il est activé par le déplacement du potentiel de membrane précédant la dépolarisation imposée et, en raison de sa contemporanéité avec le courant entrant, induit une apparente diminution de ce dernier. Ce courant est également décrit par MOUNIER et VASSORT (1975) sur la fibre musculaire de Crabe et par VASSORT (1975) sur l'utérus de Cobaye.

Bien que sur ces structures, le courant entrant soit de nature calcique alors qu'il est transporté par les ions sodium dans le cas de la fibre musculaire de Batracien, il est intéressant de noter que, sur ces différentes préparations, le décours des courbes h_∞ - potentiel obtenues en milieu normal est le même, c'est à dire qu'il présente une diminution du courant entrant quand la membrane est préhyperpolarisée.

Si sur la fibre musculaire squelettique de Batracien un tel courant est présent, il semble qu'il soit inactivé au potentiel de repos et que seule une préhyperpolarisation l'active ; en effet, comme le montre la figure 47, pour un potentiel imposé de + 50 mV, le décours des courants

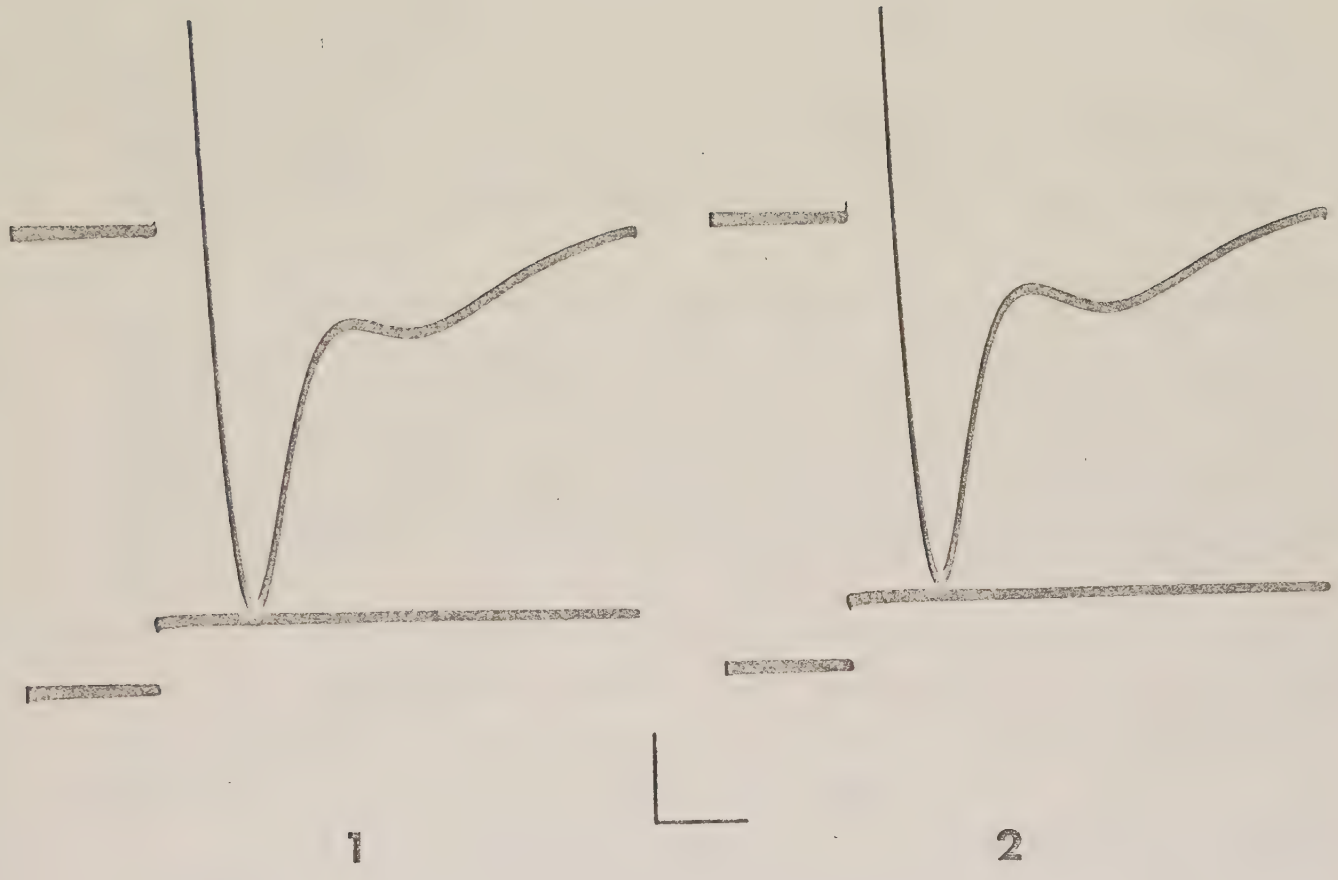


Figure 47 - Décours des courants entrants initial et tardif en milieu normal (1) et en présence de TEA (2).

Echelle horizontale : 1 ms.

Echelle verticale : 50 mV.

entrants initial et tardif en milieu normal et en présence de TEA est très sensiblement le même.

Si un courant potassique rapide et transitoire existe au niveau de la membrane tubulaire, le problème de la voie de passage empruntée par ce courant est alors posé :

a) Les ions potassium peuvent-ils passer par le canal dit de "rectification retardée" ?

En théorie, le passage d'un courant potassium par le canal "lent" étant sous la dépendance de la conductance retardée g_K, que nous ne pouvons supposer activée au moment du pic de courant sodium, cette hypothèse doit être écartée.

Par ailleurs, si les ions potassium pendant cette phase rapide de courant sortant, empruntaient cette voie de passage, ce courant devrait pouvoir être mis en évidence lorsque le courant entrant sodique est supprimé par la tétrodotoxine, or les expériences réalisées en présence de cet inhibiteur de la perméabilité sodique, n'ont pas permis une individualisation de ce courant, ce qui nous conduit à envisager une autre voie de passage.

b) Les ions potassium peuvent-ils passer par le canal sodium ?

CHANDLER et MEVES (1964, 1965) montrent que, sur l'axone géant de Calmar, le canal sodium est perméable aux ions potassium, le rapport des perméabilités P_K / P_{Na} étant égal à 1/12.

Il est possible de supposer que, sur la fibre musculaire striée de Batracien, le canal sodium soit aussi perméable aux ions potassium et que le courant potassique rapide emprunte cette voie de passage. Ce courant engendré par une préhyperpolarisation membranaire aurait une cinétique déterminée par les caractéristiques du canal "rapide" sous la dépendance des variables "m" ouvrant rapidement le passage aux ions empruntant cette voie et "h" le refermant lentement.

Cette hypothèse, supportée par les résultats de nos expériences en présence de tétrodotoxine, implique cependant un rapport de perméabilité P_K/P_{Na} très sensiblement différent de celui rapporté par CHANDLER et MEVES, pour rendre compte des diminutions du courant sodium observées. Cependant, ce phénomène ne concernant que le courant sodium d'origine tubulaire, on pourrait envisager que les caractéristiques du canal "rapide" tubulaire soient telles qu'il serait moins "selectif" à l'égard du potassium que le canal "rapide" de la membrane de surface.

Les résultats expérimentaux que nous avons rapportés permet-

tent de proposer l'intervention d'un courant potassique pendant la phase de courant entrant et le passage des ions, transportant ce courant, par le canal rapide. Il est possible qu'un tel courant ne rende compte, en fait, que d'une partie de la diminution du courant entrant observé.

Nous avons mentionné que la diminution du courant sodium entrant n'est pas constante d'une préparation à l'autre.

Or les mesures du courant entrant à composante potassique pendant la préhyperpolarisation font apparaître une relation de proportionnalité entre l'amplitude de ce courant et la diminution (exprimée en valeur de "h") du courant entrant (figure 48).

- à de faibles courants entrants à composante potassique correspondent de faibles diminutions du courant sodium.

- à de forts courants entrants, des diminutions plus importantes du courant sodium.

L'amplitude du courant potassique sortant pourrait être ainsi modulée suivant l'importance de la diminution de la concentration en potassium dans les tubules qui conduit à une variation de la "driving-force" $(E - E_K)$.

Conclusion.

Si nous pensons avoir, au moins en partie, répondu au problème posé par le décours particulier des courbes h_∞ - potentiel obtenues dans le domaine des préhyperpolarisations élevées, nous ne pouvons actuellement proposer une explication plus complète du phénomène observé.

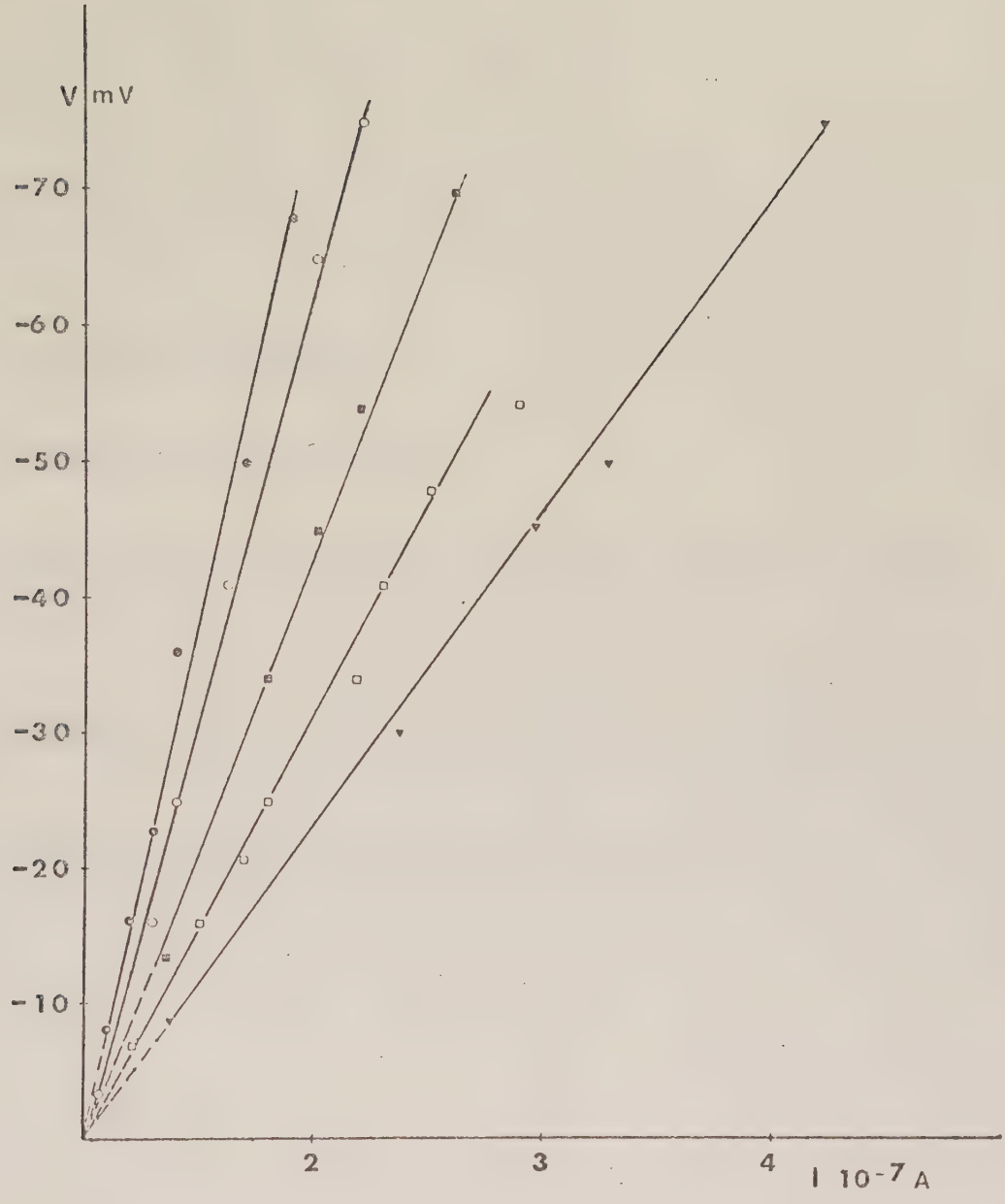


Figure 48 - Relation entre l'amplitude du courant entrant I pendant la pré-hyperpolarisation V et la diminution maximum (exprimée en valeur de "h") du courant sodique entrant.
Le courant I est mesuré au bout de 15 ms.

(●) h = 0,82 (□) h = 0,56

(○) h = 0,76 (▽) h = 0,44

(▪) h = 0,65

TROISIEME PARTIE

I - ETUDE DES COURANTS DE MEMBRANE DE FIBRES DETUBULEES.

1) Courant sodique entrant.

2) Courant potassique sortant.

3) Mesure de la résistance membranaire et de la rectification retardée.

II - ETUDE DE L'INACTIVATION DU SYSTEME SODIQUE.

Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

DISCUSSION.

I - ETUDE DES COURANTS DE MEMBRANE DE FIBRES DETUBULEES.

Les fibres sont détubulées suivant la technique de HOWELL et JENDEN, 1967 (voir Matériel et Méthodes).

Conformément aux résultats d'autres auteurs (voir Historique, chapitre III) nous avons observé que la rupture du système tubulaire transverse se traduit par l'abolition de la réponse contractile et la disparition du potentiel consécutif ; les phases de dépolarisation et de repolarisation rapide du potentiel d'action ne sont pas modifiées par rapport à celles d'un potentiel de fibre normale (figure 49).

1) Courant sodique entrant.

Il n'a jamais été observé de deuxième courant entrant ou "courant tardif" ce qui a apporté, comme nous l'avons précédemment mentionné, un élément important à notre hypothèse de son origine tubulaire.

La relation courant-potentiel obtenue pour le courant entrant sodique est analogue à celle établie pour des fibres normales : le courant est entrant à partir d'une dépolarisation imposée de +30 mV, atteint son amplitude maximum à +50 mV et s'inverse vers +130 mV (figure 50).

Le décours de la phase d'inactivation du courant sodique est analysé en coordonnées semi-logarithmiques.

En effet, sur des fibres normales, ILDEFONSE et ROY (1972) mentionnent, pour de faibles dépolarisations, particulièrement à +55 mV, une différence entre les courants calculés et les courants expérimentaux en ce qui concerne la phase d'inactivation, plus lente pour les courant calculés. Le tracé en coordonnées semi-logarithmiques du décours de l'inactivation à +55 mV montre qu'il évolue en deux phases dont les constantes de temps sont de 0, 23 et 0, 45 ms. La divergence entre courants théoriques et expérimentaux est interprétée par ces auteurs comme une conséquence possible d'une activité au niveau du système tubulaire transverse.

Nous avons, à partir de ces données, réalisé une analyse en coordonnées semi-logarithmiques des courants sodium enregistrés sur des fibres normales et sur des fibres détubulées pour des dépolarisations d'environ +50 mV, ce qui nous a conduite à étudier quatre cas :

a) le courant sodium global.

Le décours de la phase d'inactivation présente deux phases.

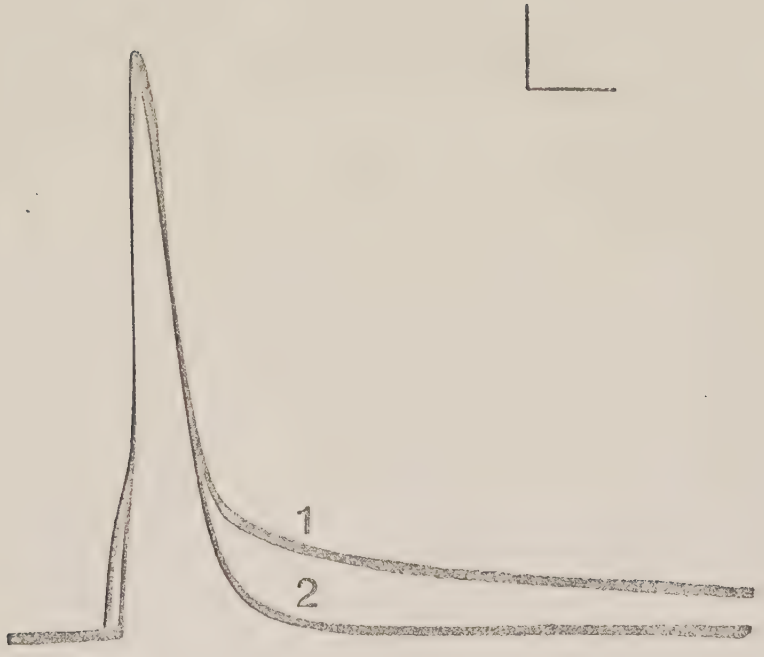


Figure 49 - Décours des potentiels d'action obtenus sur la même fibre, normale (1) puis détubulée (2).

Echelle horizontale : 5 ms.
Echelle verticale : 20 mV.

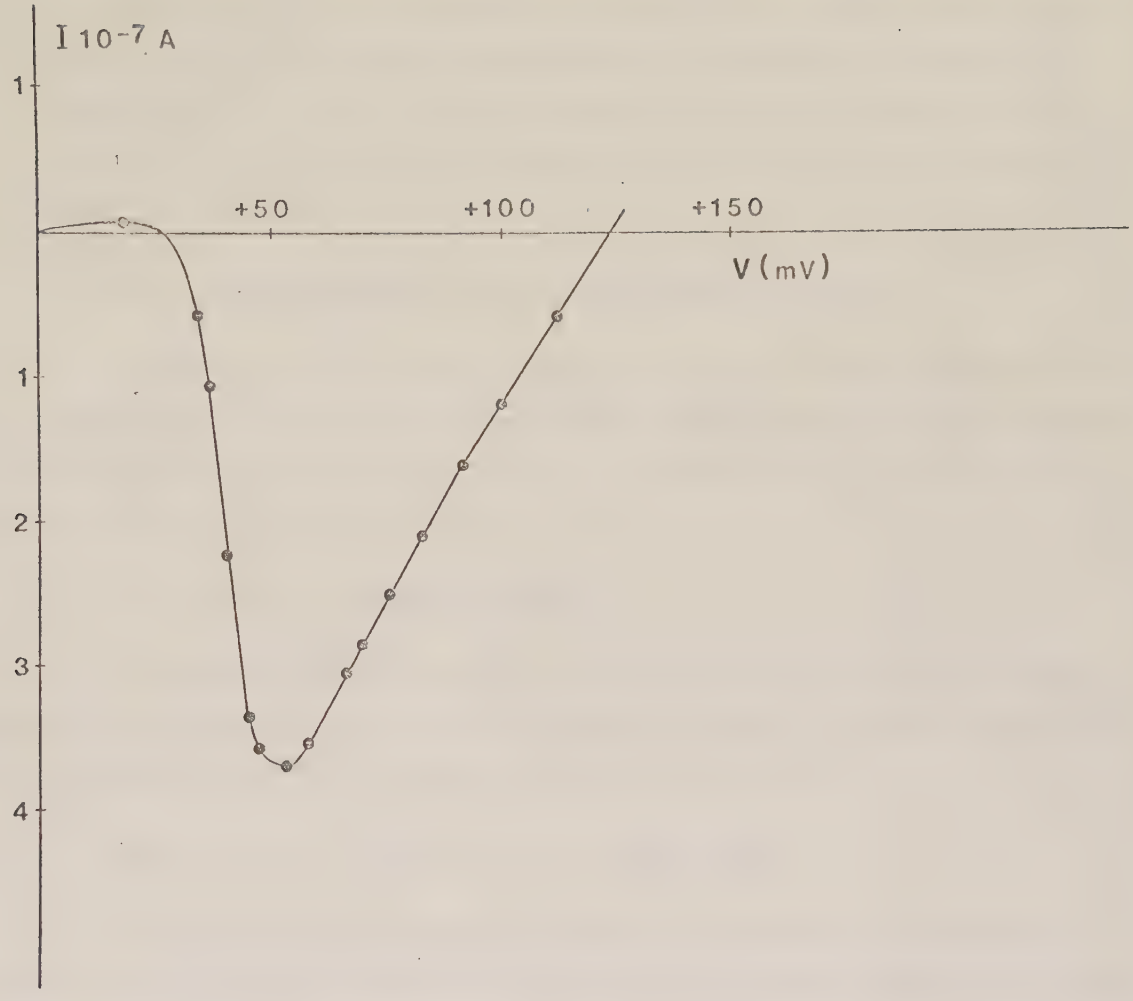


Figure 50 - Relation courant-potentiel établie pour le courant sodium d'une fibre détubulée.

Les valeurs des constantes de temps calculées pour quatre fibres sont de 1, 1,3 , 1,5 et 1,6 ms pour la phase rapide, 2,4 , 2,6 , 2,8 et 3 ms pour la phase lente.

Ces valeurs sont nettement supérieures à celles données par ILDEFONSE et ROY (1972) mais nos expériences ayant été réalisées à basse température (8 à 12°C), nos résultats en tenant compte d'un Q_{10} de 3 à 3,5, sont en accord avec ceux que ces auteurs obtiennent pour des températures de 20 à 23°C.

b) le courant initial de surface de fibre normale.

Le décours de l'inactivation du premier courant entrant attribué à la membrane de surface évolue en une seule phase. Calculée à partir de l'enregistrement présenté sur la figure 14, page 43, la constante de temps pour cette préparation est de 0,7 ms.

c) le courant tardif tubulaire.

Le décours de l'inactivation du courant sodium tardif évolue également en une seule phase. La constante de temps, calculée à partir de l'enregistrement donné sur la figure 14, est de 1,4 ms.

d) le courant sodium de fibres détubulées.

Le tracé en coordonnées semi-logarithmiques du décours de l'inactivation du courant sodium fait apparaître une seule phase. Les constantes de temps calculées pour deux préparations sont de 2 et 2,8 ms. Ces valeurs sont à comparer à celles de la phase rapide du courant sodium global.

Nous constatons qu'elles sont légèrement plus élevées, les conditions de température étant dans les deux cas semblables.

Il apparaît ainsi que, lorsqu'une activité tubulaire n'interfère pas sur le courant de surface, la phase d'inactivation de ce dernier se développe plus lentement. Ce résultat est à rapprocher de la divergence observée par ILDEFONSE et ROY (1972) entre courants théoriques et courants expérimentaux.

Nos résultats sont présentés sur la figure 51.

2) Courant potassique sortant.

Sur des fibres normales, le courant sodique entrant est suivi par un courant potassique sortant, également dépendant du potentiel et du

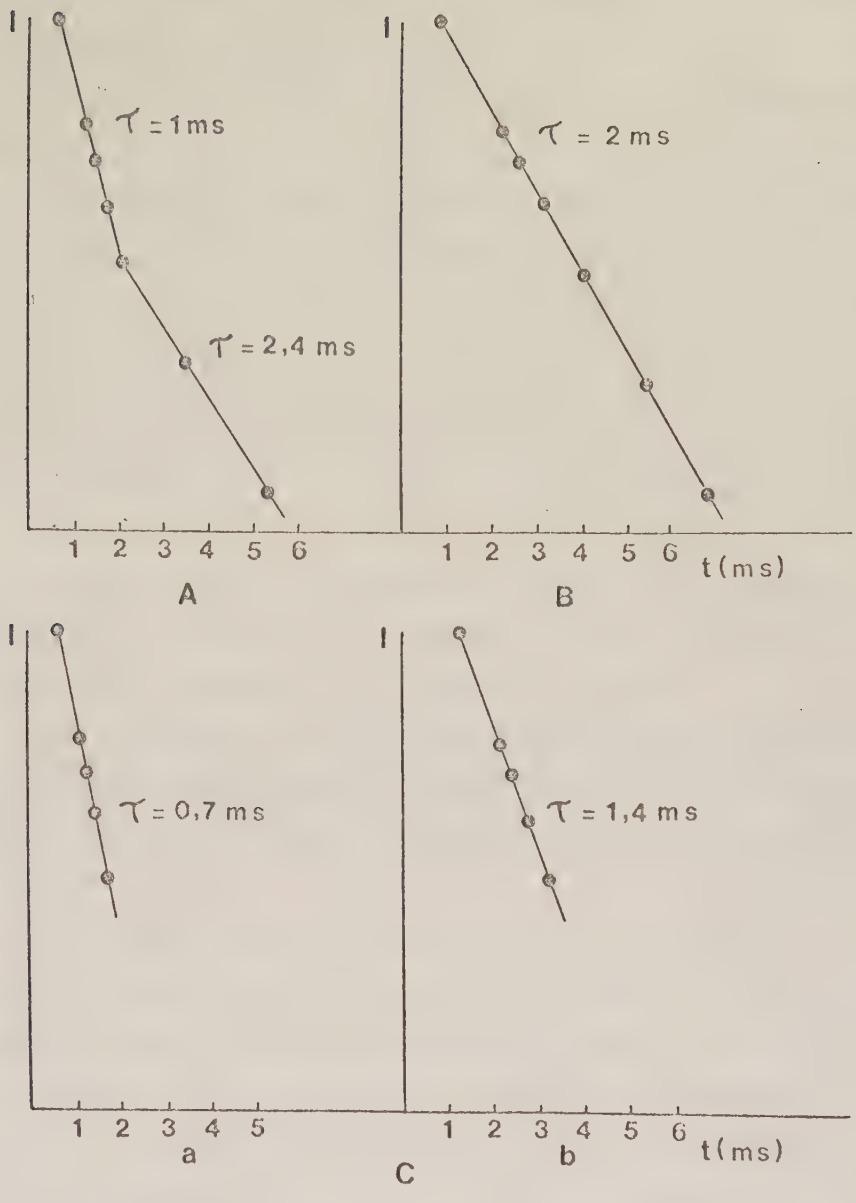


Figure 51 - Analyse en coordonnées semi-logarithmiques.

A - d'un courant sodium global.

B - d'un courant sodium de fibre détubulée.

C-a : du courant sodium initial.

C-b : du courant sodium tardif.

Les tracés C_a et C_b sont réalisés à partir de l'enregistrement des deux courants entrants présenté sur la figure 14.

temps. Ce courant traduit l'augmentation retardée de la conductance potassique g_K ("delayed rectification").

Nous avons recherché si ce courant se développe également sur des fibres détubulées.

Des dépolarisations de durée égale à 50 ms et d'amplitude croissante de +10 à +110 mV sont imposées à la membrane ; l'amplitude du courant sortant est mesurée à la fin de l'impulsion.

Sur la figure 52, est représentée la relation courant-potentiel établie pour ce courant. La droite tracée sur cette même figure est la caractéristique courant de fuite-potentiel obtenue par extrapolation des valeurs de ce courant mesurées pour les faibles hyperpolarisations et dépolarisations.

A partir d'une dépolarisation de +40 mV, le courant sortant augmente rapidement en fonction du potentiel et le décours de la relation établie est du type de celle obtenue sur des fibres normales.

Nos résultats sont ici en désaccord avec ceux présentés par ILDEFONSE (1970) qui mentionne l'absence de courant potassique retardé sur des préparations détubulées ; la relation courant-potentiel obtenue est linéaire.

Deux observations corroborent nos résultats :

- nous avons précédemment rapporté que la phase de repolarisation rapide du potentiel d'action d'une fibre normale résulte à la fois de l'inactivation du système sodique et de l'activation du système potassique ; par conséquent, si, sur une fibre détubulée, n'intervenait pas une augmentation de la conductance potassique g_K participant à la repolarisation de la membrane, cette phase du potentiel d'action devrait être allongée. Or, comme le montre la figure 49, les potentiels d'action enregistrés sur la même fibre normale puis détubulée ont des phases de repolarisation rapide superposables.

- en présence de tetraéthylammonium (TEA), inhibiteur de la perméabilité potassique, la phase de repolarisation du potentiel d'action d'une fibre détubulée est allongée par rapport à celle du potentiel de référence enregistré en Ringer normal sur la même fibre (figure 53).

3) Mesure de la résistance membranaire et de la rectification retardée.

Parallèlement aux enregistrements de courants, des mesures de résistance membranaire et de rectification retardée ont été réalisées sur la même fibre normale puis détubulée.

Des impulsions de courant de durée égale à 100 ms et d'inten-

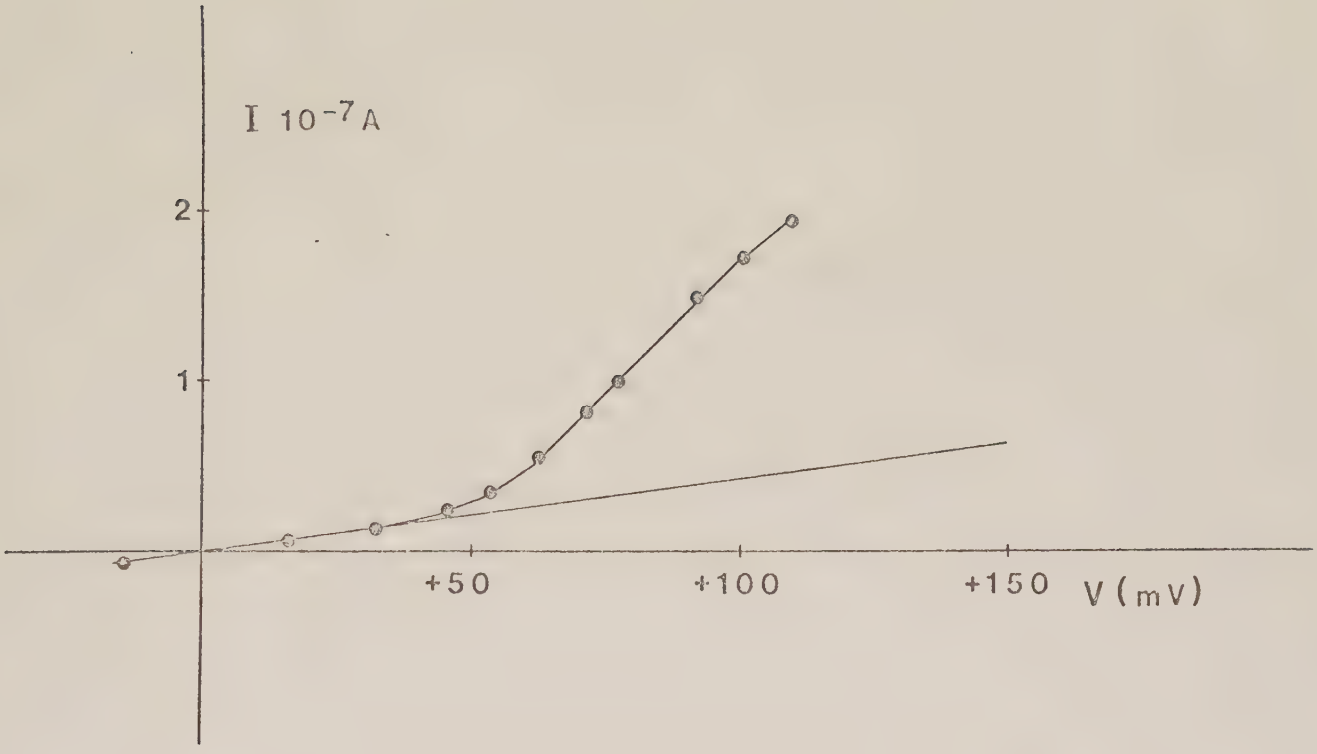


Figure 52 - Relation courant-potentiel établie pour le courant potassium sortant d'une fibre détubulée.
La droite représente la caractéristique courant de fuite-potentiel obtenue par extrapolation des valeurs de ce courant mesurés pour les faibles hyperpolarisations et dépolarisations.

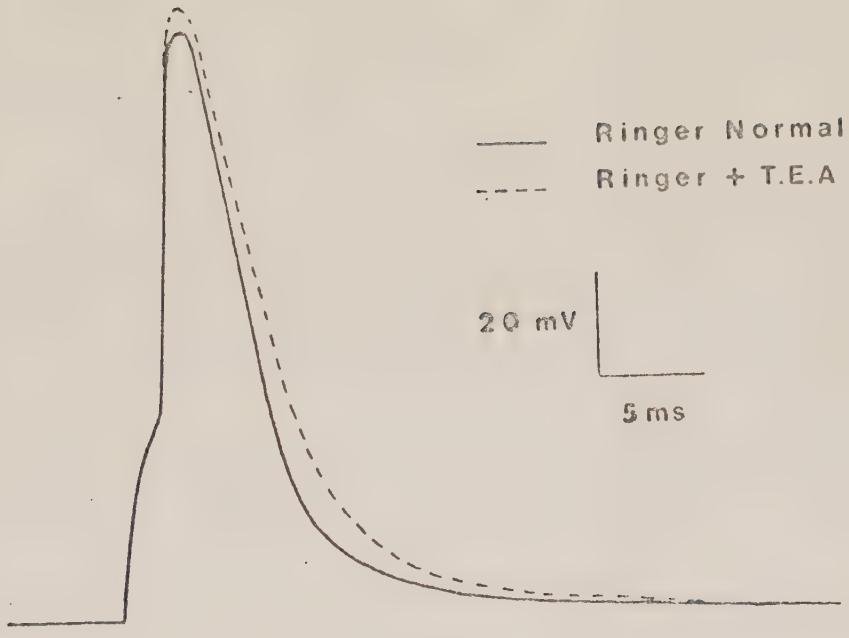


Figure 53 - Décours des potentiels d'action d'une fibre détubulée en Ringer normal et en présence de TEA.

sité croissante sont appliquées à la membrane.

Les mesures de variations de potentiel lorsque le courant imposé est entrant (hyperpolarisant) réalisées sur la même préparation avant et après détubulation permettent de comparer les résistances membranaires à l'état stationnaire. Pour l'expérience illustrée par la figure 54, les droites représentant les relations entre les variations de courant et les variations de potentiel sont superposables ; d'après ce résultat la résistance de la membrane de surface et celle de la membrane tubulaire serait de même valeur. Par contre, la figure 55 montre que la résistance membranaire de la fibre détubulée est plus faible que celle de la même fibre avant le traitement au glycérol. Il est possible que cette chute de résistance soit seulement due au traitement conduisant à la détubulation.

Les mesures de variations de potentiel lorsque le courant imposé est dépolarisant, réalisées comme précédemment avant et après détubulation mettent en évidence (figures 54 et 55) que la membrane de surface (fibre détubulée) présente le phénomène de rectification retardée, la rectification étant cependant moins importante par rapport à celle de la fibre normale.

II - ETUDE DE L'INACTIVATION DU SYSTEME SODIQUE.

Nous avons montré dans le chapitre consacré à l'étude de l'inactivation du système sodique de fibres normales la divergence entre l'évolution du courant initial attribué à la membrane de surface et celle du courant tardif supposé d'origine tubulaire, sous l'effet d'hyperpolarisations préalables de la membrane.

La même étude réalisée sur des fibres dont le système tubulaire transverse est sélectivement détruit devait nous permettre de vérifier que le courant sodium de la membrane de surface ne présente pas cette diminution qui caractérise le courant tubulaire.

Effet de préhyperpolarisations en milieu normal.

Comme le montrent les figures 56 et 57, le courant sodium n'est jamais diminué même lorsque la membrane est soumise à des hyperpolarisations préalables de valeur élevée.

Au potentiel de repos, le courant est presque toujours légèrement inactivé. Cependant, si, pour certaines préparations, les valeurs de h sont comprises entre 0,9 et 1 ou très proches de 0,9 (figure 56), des valeurs plus faibles, autour de 0,7, ont été trouvées (figure 57). Ces va-

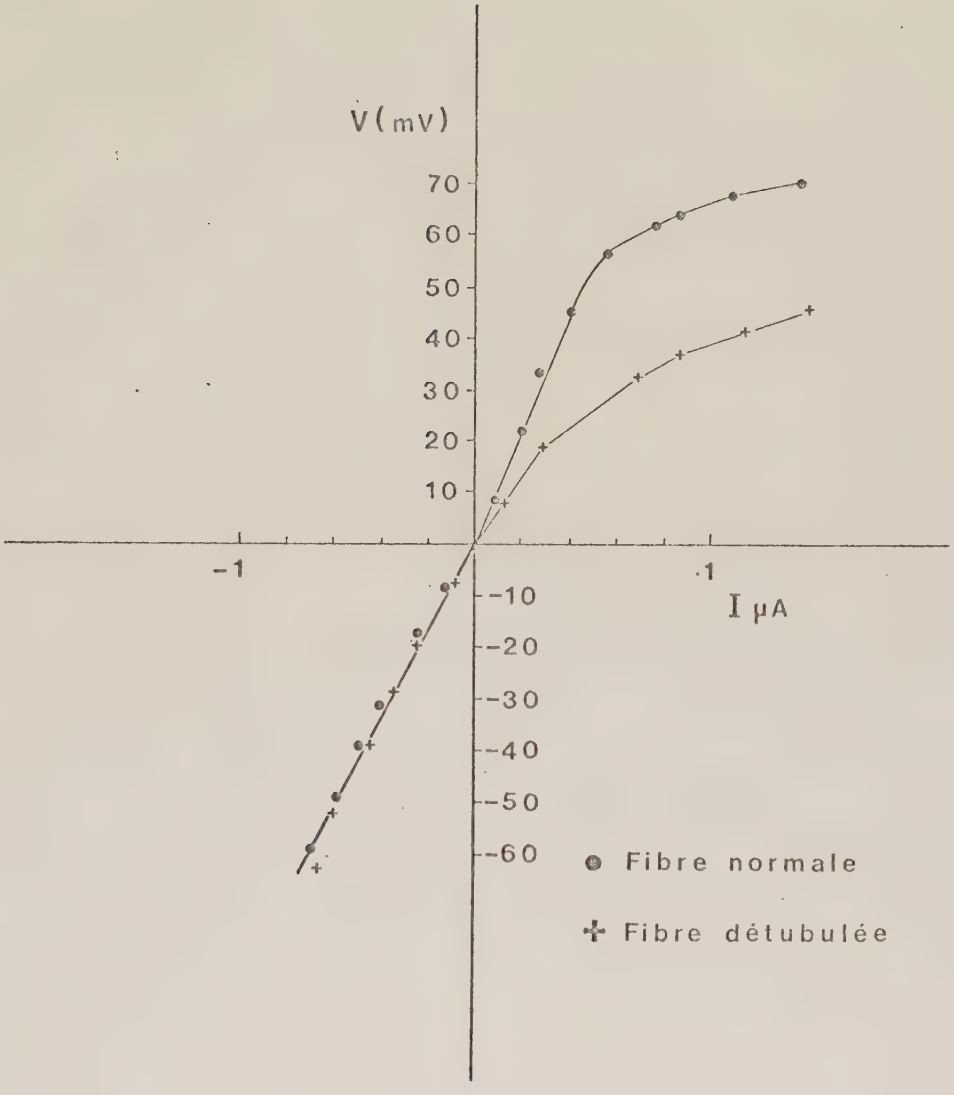


Figure 54 - Mesure de la résistance membranaire et de la rectification retardée sur la même fibre, normale puis détubulée.

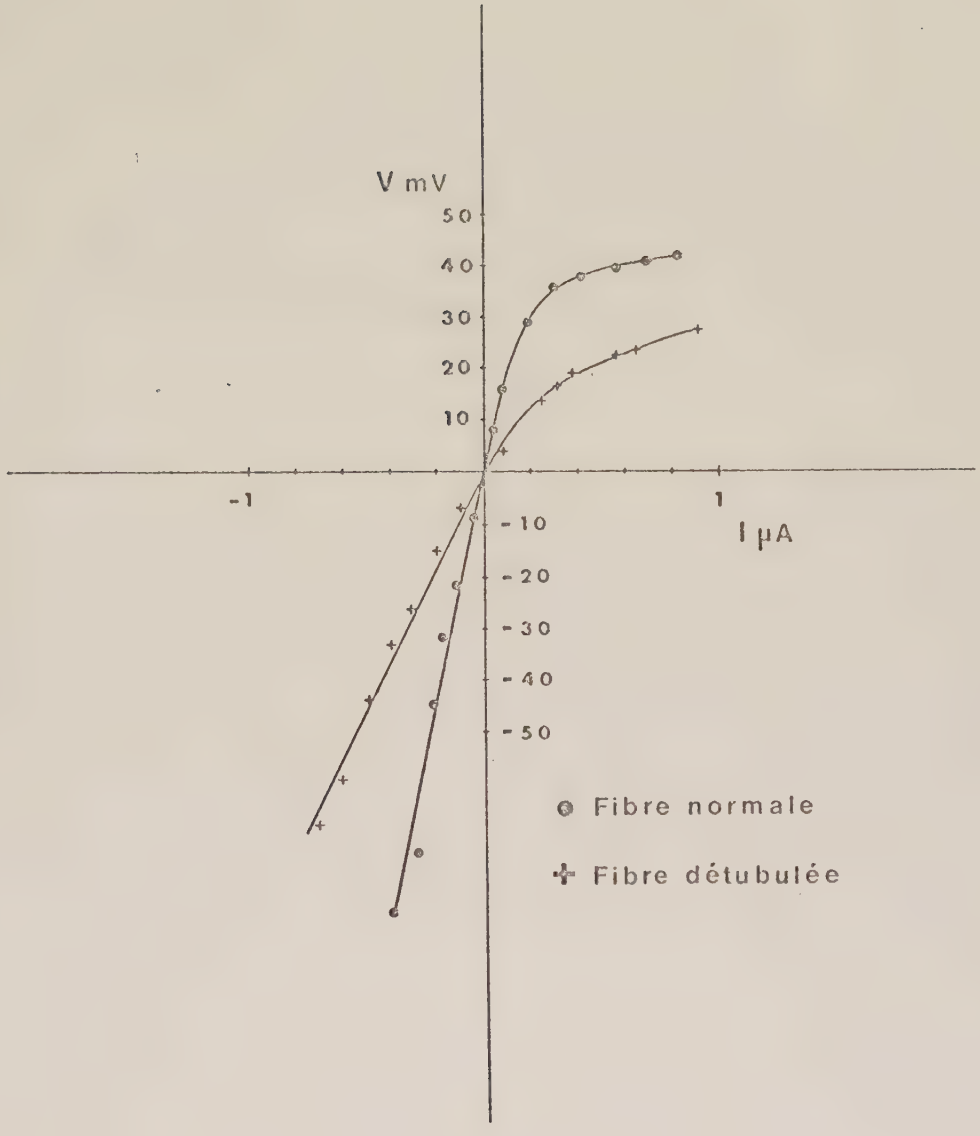


Figure 55 - Mesure de la résistance membranaire et de la rectification retardée sur la même fibre, normale puis détubulée.

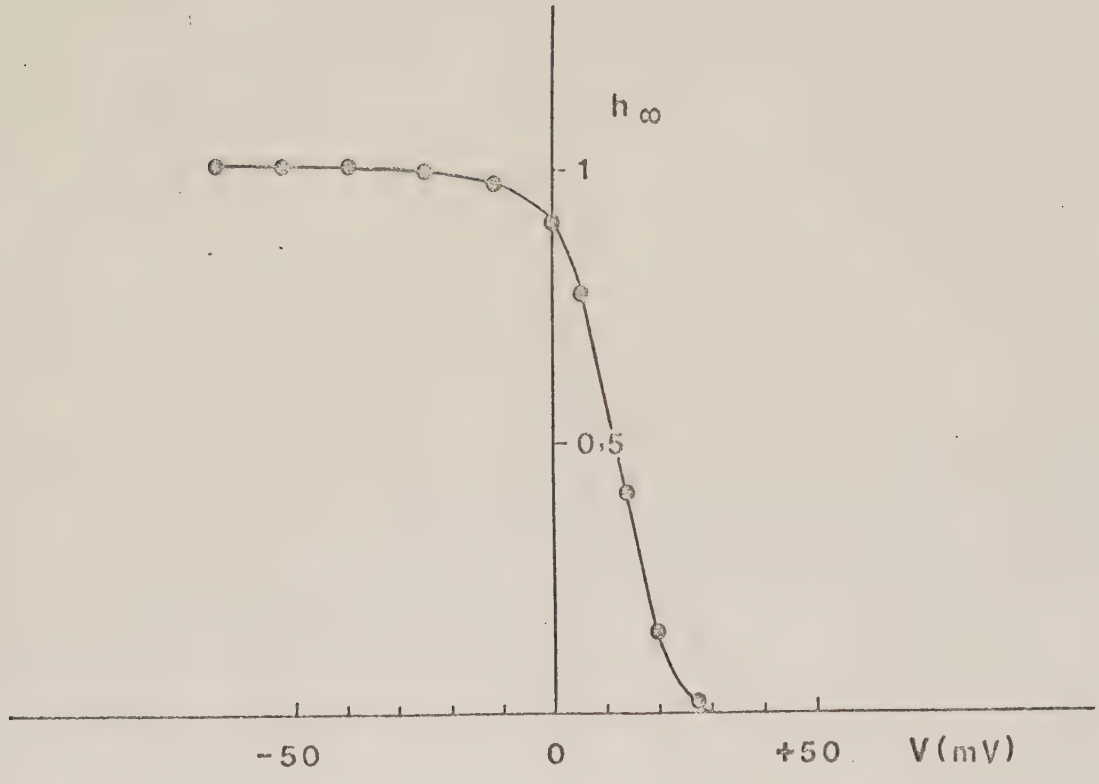


Figure 56 - Courbe h_∞ - potentiel d'une fibre détubulée.

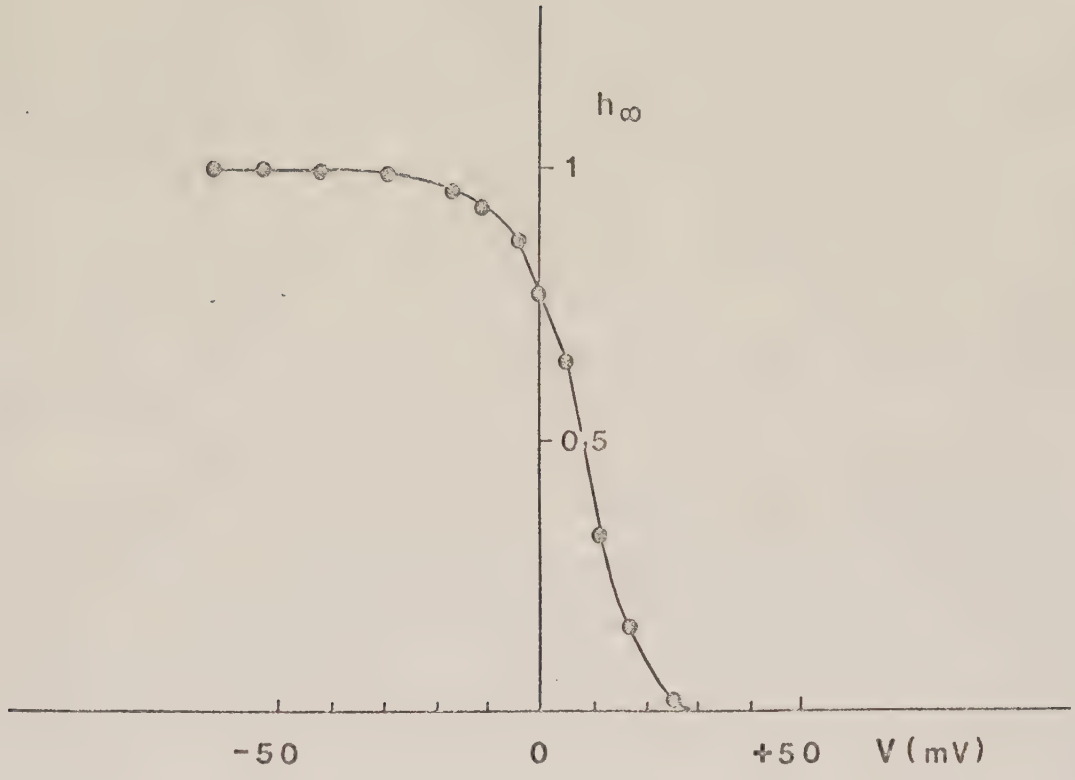


Figure 57 - Courbe h∞ - potentiel d'une fibre détubulée.

leurs sont données sur le tableau III.

Sur des fibres normales, les valeurs de h_∞ au potentiel de repos sont soit égales à 1 soit comprises entre 0, 9 et 1. Nous avions repris, l'explication proposée par ILDEFONSE (1970) pour rendre compte de nos résultats (voir Deuxième partie, page 77).

Or, les fibres détubulées peuvent avoir, par suite du traitement au glycérol, des valeurs de potentiel de membrane au repos légèrement inférieures à la valeur théorique de -90 mV ; il n'est donc pas surprenant d'obtenir des valeurs de h voisines de 0, 9.

Des valeurs de h plus faibles, autour de 0, 7, sont obtenues mais, si nous comparons les courbes h_∞ - potentiel présentées sur les figures 56 et 57, nous voyons qu'un déplacement de 5 mV vers la gauche, donc vers les hyperpolarisations, du zéro de la courbe 57, permet la quasi-superposition des deux courbes.

Donc, le groupe de fibres pour lequel la valeur de h_∞ au potentiel de repos est d'environ 0, 7 ne serait que très faiblement plus dépolarisé que le groupe de fibres donnant une valeur de h_∞ autour de 0, 9.

Lorsque la membrane est prédépolarisée, le courant diminue suivant un décours tout à fait comparable à celui d'une fibre normale et s'annule pour une variation de potentiel comprise entre +20 et +40 mV. Ces valeurs de même que les variations de potentiel V correspondant à la demi-inactivation sont données sur le Tableau III. Quelques valeurs de V sont plus faibles par suite de la plus faible valeur de h au potentiel de repos.

DISCUSSION.

L'étude réalisée sur des fibres détubulées confirme l'hypothèse de l'origine tubulaire du courant entrant tardif puisque ce courant n'est jamais observé sur ces préparations.

Nous constatons d'autre part que le courant sodium de fibres détubulées et le courant initial entrant de fibres normales, attribué à la membrane de surface, évoluent de la même façon lorsque la membrane est préhyperpolarisée, se maintenant à une amplitude constante. Le courant initial, comme nous l'avons supposé, est donc bien le courant se développant au niveau de la membrane de surface.

Le décours particulier des courbes h_∞ - potentiel dans le domaine des préhyperpolarisations concerne donc seulement le courant sodium tubulaire, que celui-ci soit distinct du courant de surface ou confondu

TABLEAU III

V pour h = 0,5	h_∞ à E_R	V' pour $I_{Na} = 0$
+ 8 mV	0,73	+ 23 mV
+ 18	0,95	+ 32
+ 8	0,76	+ 30
+ 12	0,94	+ 36
+ 10	0,73	+ 34
+ 6	0,66	+ 25
+ 8	0,76	+ 30
+ 30	0,94	+ 45
+ 20	0,92	+ 36
+ 23	0,89	+ 38
+ 2	0,58	+ 20
+ 5	0,71	+ 23
+ 17	0,85	+ 30
+ 10	0,88	+ 28

V est la variation de potentiel donnant la demi-inactivation.

V' est la variation de potentiel pour lequelle le courant s'annule.

E_R est le potentiel de membrane au repos.

avec lui.

Nous mettons en évidence l'existence d'un courant potassique sortant, résultat d'opposant à celui d' ILDEFONSE (1970). Cependant, ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN (1970, b) supposent qu'une grande partie de la rectification retardée doit être située au niveau de la membrane plasmique externe.

- RESUME GENERAL -

Sur des fibres dont le système tubulaire transverse est intact, nous avons observé qu'après le courant initial sodique entrant se développe un deuxième courant entrant ou "courant entrant tardif".

Le courant tardif évolue en fonction du temps, présentant une phase d'activation et une phase d'inactivation, et en fonction du potentiel imposé. Pour des potentiels imposés compris entre +40 et +90 mV, il est parfaitement distinct du courant initial et la relation courant-potentiel que l'on peut établir pour ces valeurs est du même type que celle obtenue pour le courant initial.

L'amplitude du courant entrant tardif est, comme celle du courant initial, fonction de la concentration en sodium du milieu extracellulaire.

Le courant tardif est supprimé par la tétrodotoxine (TTX), inhibiteur de la perméabilité sodique.

Il persiste quand on diminue la concentration externe en calcium ou lorsqu'on supprime le calcium, ces résultats permettent d'éliminer une possible participation des ions calcium à ce courant.

Il n'est pas aboli par le chlorure de manganèse, inhibiteur de la perméabilité calcique.

Ce courant est donc très vraisemblablement de nature sodique comme le courant initial.

Les caractéristiques électriques et la nature ionique du courant entrant tardif, en tous points semblables à celle du courant initial ainsi que l'existence d'un système membranaire supposé de type "excitable" nous ont conduite à formuler l'hypothèse suivant laquelle ce deuxième courant serait d'origine tubulaire.

Notre hypothèse semble confirmée par le fait que le rétablissement des deux courants entrants, initial de surface et tardif tubulaire, momentanément abolis par la suppression du sodium extracellulaire, s'effectue avec un décalage temporel si la diffusion des ions sodium dans les tubules, lors du retour en solution de concentration sodique normale, est retardée par l'addition de dextrane dans le milieu.

Ce courant tubulaire peut être confondu avec le courant initial de surface en un seul courant global à double composante.

Il est plus fréquemment observé et mieux individualisé sur des fibres de gros diamètre (environ 120 μm).

L'amplitude du courant sodium lors d'une dépolarisation imposée est fonction du niveau préalable du potentiel de membrane.

Nous mettons en évidence que, lorsque la membrane est sou-

mise à des préhyperpolarisations dans une gamme d'amplitudes élevées, le courant sodium tardif tubulaire diminue alors que le courant sodium initial de surface se maintient à une amplitude constante.

Cette diminution est supprimée par l'addition dans le milieu de survie de tetraéthylammonium (TEA) ou par l'absence de potassium dans la solution de Ringer.

Nous envisageons l'existence d'un courant potassique sortant, rapide et transitoire, contemporain du courant sodium entrant qui apparaît ainsi diminué.

L'expérimentation réalisée sur des fibres détubulées est en accord avec l'hypothèse de l'origine tubulaire du courant entrant tardif puisque ce courant n'est jamais observé sur ces préparations.

Elle confirme que la diminution du courant sodium est bien un phénomène localisé au niveau de la membrane tubulaire.

Elle fait apparaître que le phénomène de rectification retardée est, au moins en partie, situé au niveau de la membrane plasmique externe.

- BIBLIOGRAPHIE -

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. et HODGKIN, A.L. (1966) - Voltage-clamp experiments in skeletal muscle fibres.
J. Physiol., London, 186, 51-52P.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. et HODGKIN, A.L. (1968) - Voltage-clamp experiments in skeletal muscke fibers.
J. Gen. Physiol., 51, 188s-192s.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. et HODGKIN, A.L. (1969) - The Kinetics of mechanical activation in frog muscle.
J. Physiol., London, 204, 207-230.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. et HODGKIN, A.L. (1970 a) - Voltage-clamp experiments on striated muscle fibres.
J. Physiol., London, 208, 607-644.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. et HODGKIN, A.L. (1970 b) - Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle.
J. Physiol., London, 208, 645-668.

ADRIAN, R.H., COSTANTIN, L.L. et PEACHEY, L.D. (1969) - Radial spread of contraction in frog muscle fibres.
J. Physiol., London, 204, 231-257.

ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H. (1962 a) - The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.
J. Physiol., 163, 61-103.

ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H. (1962 b) - Potassium conductance of frog muscle membrane under controlled voltage.
J. Physiol., 163, 104-114.

ADRIAN, R.H. et PEACHEY, L.D. (1973) - Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle.
J. Physiol., London, 235, 103-131.

ALMERS, W. (1972 a) - Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules.
J. Physiol., London, 225, 33-56.

ALMERS, W. (1972 b) - The decline of potassium permeability during extreme hyperpolarisation in frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 225, 57-83.

BARRY, P.H. et ADRIAN, R.H. (1973) - Slow conductance changes due to potassium depletion in the transverse tubules of frog muscle fibers during hyperpolarizing pulses.
J. Membrane Biol., 14, 243-292.

BASTIAN, J. et NAKAJIMA, S. (1974) - Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 63, 257-278.

BERNSTEIN, J. (1902) - Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme.
Pflügers Arch., 92, 521-562.

BERNSTEIN, J. (1912) - Elektrobiologie, Braunschweig : Vieweg.

BEZANILLA, F., CAPUTO, C., GONZALEZ-SERRATOS, H. et VENOSA, R.A. (1972) - Sodium dependance of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibres of the frog.
J. Physiol., London, 223, 507-523.

BOYLE, P. et CONWAY, E.J. (1941) - Potassium accumulation in muscle and associated changes.
J. Physiol., London, 100, 1-63.

CAPUTO, C. et DIPOLO, R. (1973) - Ionic diffusion delays in the transverse tubules of frog twitch muscle fibres.
J. Physiol., London, 229, 547-557.

CHANDLER, W.K. et MEVES, H. (1964) - Voltage-clamp experiments on perfused giant axons.
J. Physiol., London, 173, 31-32P.

CHANDLER, W.K. et MEVES, H. (1965) - Voltage-clamp experiments on internally perfused giant axons.
J. Physiol., London, 180, 788-820.

CHIARANDINI, D.J. et STEFANI, E. (1973) - Effect of manganese on the electrical mechanical properties of frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol., London, 232, 129-147.

COLE, K.S. (1949) - Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane.
Arch. Sci. Physiol., 3, 253-258.

COSTANTIN, L.L. (1970) - The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 55 , 703-715.

COSTANTIN, L.L. et PODOLSKY, R.J. (1967) - Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 50, 1101-1124.

DULHUNTY, A.F. et GAGE, P.W. (1973) - Differential effects of glycerol treatment on membrane capacity and excitation-contraction coupling in toad sartorius fibres.
J. Physiol., London, 234, 373-408.

EISENBERG, B. et EISENBERG, R.S. (1968) - Selective disruption of the sarcotubular system in frog sartorius muscle.
J. Cell. Biol., 39, 451-467.

EISENBERG, R. S. et GAGE, P. W. (1967) - Frog skeletal muscle fibers : changes in electrical properties after disruption of transverse tubular system.
Science, 158, 1700-1701.

EISENBERG, R. S. et GAGE, P. W. (1969) - Ionic conductances of the surface and transverse tubular membranes of frog sartorius fibers.
J. Gen. Physiol., 53, 279-297.

EISENBERG, R. S., HOWELL, S. N. et VAUGHAN, P. C. (1971) - The maintenance of resting potential in glycerol treated muscle fibres.
J. Physiol., London, 215, 95.

EISENBERG, R. S., VAUGHAN, P. C. et HOWELL, J. N. (1972) - A theoretical analysis of the capacitance of muscle fibers using a distributed model of the tubular system.
J. Gen. Physiol., 59, 360-373.

ENDO, M. (1966) - Entry of fluorescent dyes into the sarcotubular system of the frog muscle.
J. Physiol., London, 185, 224-238.

FALK, G. et FATT, P. (1964) - Linear electrical properties of striated muscle fibers observed with intracellular electrodes.
Proc. Roy. Soc. B, 160, 69-123.

FATT, P. et GINSBORG, B. L. (1958) - The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres.
J. Physiol., London, 142, 516-543.

FRANK, G. B. (1957) - Negative after-potential on frog's skeletal muscle.
J. Neurophysiol., 20, 602-614.

FRANKENHAEUSER, B. (1957) - The effect of calcium on the myelinated nerve fibre.
J. Physiol., London, 137, 245-260.

FRANKENHAEUSER, B. et HODGKIN, A. L. (1957) - The action of calcium on the electrical properties of the squid axon.
J. Physiol., London, 137, 218-244.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1968) - The triadic junction in frog muscle fibers.
J. Cell. Biol., 39, 6a.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970) - Studies of the triad : I Structure of the junction in frog twitch fibers.
J. Cell. Biol., 47, 488-499.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1971) - Studies of the triad : II Penetration of tracers into the junctionnal gap.
J. Cell. Biol., 49, 196-203.

FREYGANG, W. H., GOLDSTEIN, D. A. et HELLAM, D. (1964 a) - The after-potential that follows trains of impulses in frog muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 47, 929-952.

FREYGANG, W. H., GOLDSTEIN, D. A., HELLAM, D. C. and PEACHEY, L. D. (1964 b) - The relation between the late after-potential and the size of the transverse tubular system of frog muscle.
J. Gen. Physiol., 48, 235-263.

GAGE, P. W. et EISENBERG, R. S. (1967) - Action potentials without contraction in frog skeletal muscle fibers with disrupted transverse tubules.
Science, 158, 1702-1703.

GAGE, P. W. et EISENBERG, R. S. (1969 a) - Capacitance of the surface and transverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 53, 265-278.

GAGE, P. W. et EISENBERG, R. S. (1969 b) - Action potentials, after potentials and excitation-contraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules.
J. Gen. Physiol., 53, 298-310.

GOLDMAN, D. E. (1943) - Potential, impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol., 27, 37-60.

GONZALEZ-SERRATOS, H. (1966) - Inward spread of contraction during a twitch.
J. Physiol., London, 185, 20P.

GONZALEZ-SERRATOS, H. (1971) - Inward spread of activation in vertebrate muscle fibres.
J. Physiol., London, 212, 777-799.

HAGIWARA, S. et NAKA, K. (1964) - The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca^{++}.
J. Gen. Physiol., 48, 141-162.

HAGIWARA, S. et NAKAJIMA, S. (1966) - Differences in Na^{+} and Ca^{++} spikes as examined by application of tetrodotoxine, procaine and Mn^{++}.
J. Gen. Physiol., 49, 793-806.

HENDERSSON, E. G. (1970) - Potassium exchange and after-potentials in frog sartorius muscles treated with glycerol.
J. Gen. Physiol., 56, 692-715.

HILL, A. V. (1949) - The abrupt transition from rest to activity in muscle.
Proc. Roy. Soc. B, 136, 399-420.

HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. (1939) - Action potentials recorded from inside of nerve fibre.
Nature, 144, 710-711.

HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. (1952 a) - Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo.
J. Physiol., London, 116, 449-472.

HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. (1952 b) - The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.
J. Physiol., London, 116, 473-496.

HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. (1952 c) - The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.
J. Physiol., London, 116, 497-506.

HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. (1952 d) - A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol., London, 117, 500-544.

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F. et KATZ, B. (1952) - Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo.
J. Physiol., London, 116, 424-448.

HODGKIN, A. L. et HOROWICZ, P. (1960) - The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres.
J. Physiol., London, 153, 370-385.

HODGKIN, A. L. et KATZ, B. (1949) - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J. Physiol., London, 108, 37-77.

HODGKIN, A. L. et NAKAJIMA, S. (1972 a) - The effect of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol., London, 221, 105-120.

HODGKIN, A. L. et NAKAJIMA, S. (1972 b) - Analysis of the membrane capacity in frog muscle.
J. Physiol., London, 221, 121-136.

HOROWICZ, P. (1961) - Influence of ions on the membrane potential of muscle fibers. In Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions. A. M. SHANES, Ed. 217-234.

HOWELL, J. N. et JENDEN, D. J. (1967) - T. Tubules of skeletal muscle : morphological alterations which interrupt excitation-contraction coupling.
Fed. Proc., 26, 553.

HOWELL, J. N. (1969) - A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle.
J. Physiol., London, 201, 515-533.

HUXLEY, H. E. (1964) - Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle.
Nature, London, 202, 1067-1071.

HUXLEY, A. F. et STÄMPFLI, R. (1951) - Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibres.
J. Physiol., London, 112, 496-508.

HUXLEY, A. F. et TAYLOR, R. E. (1958) - Local activation of striated muscle fibres.
J. Physiol., London, 144, 426-441.

ILDEFONSE, M. (1970) - Analyse des courants de membrane de la fibre musculaire rapide. Thèse de Sciences, Poitiers.

ILDEFONSE, M., PAGER, J. et ROUGIER, O. (1969) - Analyse des propriétés de rectification de la fibre musculaire squelettique rapide après traitement au glycérol.
C. R. Acad. Sci., Paris, 268, 2783-2786.

ILDEFONSE, M., PAGER, J. et ROUGIER, O. (1969) - Relations entre les propriétés de rectification et le système tubulaire transverse des fibres musculaires squelettiques rapides.
J. Physiol., Paris, 61, 137.

ILDEFONSE, M. et ROUGIER, O. (1968) - Activation et inactivation du courant potassium de la fibre musculaire squelettique.
C. R. Acad. Sci., Paris, 267, 2344-2347.

ILDEFONSE, M. et ROUGIER, O. (1972) - Voltage-clamp analysis of the early current in frog skeletal muscle fibre using the double sucrose-gap method.
J. Physiol., London, 222, 373-395.

ILDEFONSE, M. et ROY, G. (1972) - Kinetics properties of the sodium current in striated muscle fibres on the basis of the HODGKIN-HUXLEY theory.
J. Physiol., London, 227, 419-431.

KAO, C. Y. (1966) - Tetrodotoxine, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena.
Pharmacol. Rev., 18, 997-1049.

KAO, C. Y. et STANFIELD, P. R. (1970) - Actions of some cations on the electrical properties and mechanical threshold of frog sartorius muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 55, 620-639.

KATZ, B. (1950) - Discussion on muscular contraction.
Proc. Roy. Soc., London, Ser. B., 137, 40-87.

KATZ, B. (1966) - Nerve, muscle and synapse.
Mc Graw-Hill book company Ed., 61-62.

KILB, H. et STÄMPFLI, R. (1955) - Ein Vielweghahn zur raschen Umschaltung auf Verschiedene Durchströmungsflügssigkeiten.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 13, 191-194.

KÖNIG, K. (1962) - Membranpotentialmessungen am Skeletmuskel mit der Saccharose. Trenwand - Methode.
Pflügers Arch., 293, 34-55.

KROLENKO, S. A. et FEDOROV, V. V. (1972) - Recovery of isometric twitches after glycerol removal.
Experientia, 28, 424-425.

LING, G. et GERARD, R. W. (1949) - The normal membrane potential of frog sartorius fibres.
J. Cell. Comp. Physiol., 34, 383-396.

MANDRINO, M. (1959) - Rôle de l'ion sodium dans les modifications du potentiel consécutif des myones obtenues en milieu anionique anormal.
J. Physiol., Paris, 51, 524-525.

MARMONT, G. (1949) - Studies on the axon membrane. I.A new method.
J. Cell. Comp. Physiol., 34, 351-382.

MOORE, L. E. (1972) - Voltage-clamp experiments on single muscle fibers of Rana pipiens.
J. Gen. Physiol., 60, 1-19.

MOUNIER, Y. et VASSORT, G. (1974) - Influence of Cl^- ions on the Ca-current in crab muscle fibre.
J. Physiol., London, 242, 92-93P.

MOUNIER, Y. et VASSORT, G. (1975) - Evidence for a transient potassium membrane current dependant on Ca-influx in crab muscle fibre.
J. Physiol., London (sous presse).

NARAHASHI, T., DEGUCHI, T., URAKAWA, N. et OHKUBO, Y. (1960) - Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin.
Amer. J. Physiol., 198, 934-938.

NEHER, E. (1971) - Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons.
J. Gen. Physiol., 58, 36-53.

NOBLE, D. (1966) - Application of HODGKIN-HUXLEY equations to excitable tissues.
Physiol. Rev., 46, 1-50.

OOTA, I., TAKAUJI, M. et NAGAI, T. (1972) - Effect of manganese ions on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle.
Jap. J. Physiol., 22, 379-392.

PAGE, S. (1964) - The organization of the sarcoplasmic reticulum in frog muscle.
J. Physiol., London, 175, 10-11P.

PEACHEY, L. D. (1965) - The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius.
J. Cell. Biol., 25, 209-231.

PEACHEY, L. D. et ADRIAN, R. H. (1973) - Electrical properties of the transverse tubular system. In Structure and Function of Muscle, vol. 3, ed. Bourne, G., Academic Press : New York and London.

PERSSON, A. (1963) - The negative after-potential of frog skeletal muscle fibers.
Acta Physiol. Scand., 58, 1-32.

PORTER, K. R. et PALADE, G. E. (1957) - Studies on the endoplasmic reticulum. Its form and distribution in striated muscle cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3 , 269-300.

RAPOPORT, S. I. (1969) - A fixed charge model of the transverse tubular system of frog sartorius. J. Gen. Physiol., 54, 178.

RAPOPORT, S. I., FREYGANG, W. H. et PEACHEY, L. D. (1968) - Swelling of transverse tubular system of frog sartorius. Abstracts of the Biophysical Society 12th Annual meeting. Pittsburgh, Pennsylvania, 116.

ROUGIER, O. (1964) - Mesure de la résistance membranaire de la fibre musculaire squelettique. Etude à l'aide de la méthode dite du "sucrose-gap". C. R. Soc. Biol., Paris, 158, 343-347.

ROUGIER, O., VASSORT, G. et ILDEFONSE, M. (1968) - Analyse qualitative en voltage imposé du courant de membrane de la fibre musculaire squelettique. C. R. Acad. Sci., Paris, 266, 1754-1757.

ROUGIER, O., VASSORT, G. et STÄMPFLI, R. (1968) - Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose-gap technique. Pflügers Arch., 301, 91-108.

ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUÏL, Y. M. et CORABOEUF, E. (1969) - Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. Pflügers Arch., 308, 91-110.

STÄMPFLI, R. (1954) - A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. Experientia, 10, 508-509.

STÄMPFLI, R. (1963) - Die doppelte Saccharosetrenwandmethode zur Messung von elektrischen Membraneigenschaften mit extracellülaren Elektroden. Helv. Physiol. Acta, 21, 189-204.

STANFIELD, P. R. (1969) - The effect of the tetraethylammonium ion on the inwardly rectifying potassium channel of frog sartorius muscle. J. Physiol., London, 200, 2-3P.

STANFIELD, P. R. (1970 a) - The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. J. Physiol., London, 209, 209-229.

STANFIELD, P. R. (1970 b) - The differential effects of tetraethylammonium and zinc ions on the resting conductance of frog skeletal muscle. J. Physiol., London, 209, 231-256.

TARR, M. (1971) - Two inward currents in frog atrial muscle. J. Gen. Physiol., 58, 523-543.

VASSORT, G. (1975) - Voltage clamp analysis of transmembrane ionic current in guinea-pig myometrium. Evidence for an initial potassium activation triggered by calcium influx.
J. Physiol., London (soumis pour publication).

VAUGHAN, P. C., HOWELL, J. N. et EISENBERG, R. S. (1972) - The capacitance of skeletal muscle fibers in solutions of low ionic strength.
J. Gen. Physiol., 59, 347-359.

VERATTI, E. (1902) - Ricerche sulla fina struttura della fibra muscolare striata.
Memorie del Reale Istituto Lombardo, Classe Sci. Nat., 19, 87-133.
Traduction anglaise : J. of Biophysical and Biochemical Cytology, 1961, 10, 1-59.

WEIDMANN, S. (1955) - Effect of calcium ions and local anaesthetics on electrical properties of Purkinje fibres.
J. Physiol., London, 129, 568-582.

ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. et ADRIAN, R. H. (1972) - Observations on "detubulated" muscle fibres.
Nature New Biology, 239, 153-155.